



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
PRODUÇÃO DE RUMINANTES E NÃO RUMINANTES**

Ruan Emmanuell Franco de Abreu

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PH, TEMPERATURA E  
CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIA SOBRE O  
CRESCIMENTO, VIRULÊNCIA E EXPRESSÃO DE  
ALGUNS GENES DE *Aeromonas* spp.**

**Petrolina – PE  
2015**

**Ruan Emmanuell Franco de Abreu**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PH, TEMPERATURA E  
CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIA SOBRE O  
CRESCIMENTO, VIRULÊNCIA E EXPRESSÃO DE  
ALGUNS GENES DE *Aeromonas* spp.**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre, sob orientação da professora Dra Gisele Veneroni Gouveia e co-orientação do professor Dr Mateus Matiuzzi da Costa.

**Petrolina – PE  
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Ruan Emmanuell Franco de Abreu**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PH, TEMPERATURA E  
CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIA SOBRE O  
CRESCIMENTO, VIRULÊNCIA E EXPRESSÃO DE  
ALGUNS GENES DE *Aeromonas* spp.**

Dissertação apresentada  
como requisito para  
obtenção do título de Mestre  
em Ciência Animal, pela  
Universidade Federal do  
Vale do São Francisco

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Banca Examinadora

---

Dra Gisele Veneroni Gouveia (Titular)

---

Dr João José de Simoni Gouveia (Titular)

---

Dra Adriana Mércia Guaratini Ibelli (Titular)

A minha família, Elaine, Geraldo, Vinícius, Felipe e Clêidio que me incentivaram  
a ter chegado até aqui  
Aos peixes que foram utilizados neste estudo  
E aos meus avós *in memoriam*  
Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus primeiramente sobre todas as coisas.

A minha mãe Elaine e meu pai Geraldo, meus irmãos Vinícius e Felipe pelo apoio, amor e carinho.

Ao meu companheiro Clêidio pelo apoio, amor, incentivo e, por nunca ter deixado a peteca cair quando fraquejei.

Aos animais que tanto me fazem gostar dessa profissão que exerço, em especial Bebel, Sofia, Sophia, Raphity e Valentina.

Aos meus melhores amigos que sempre estiveram comigo e, que nesse tempo, eu pude dividir muitos momentos felizes e tristes, Marina, Ingrid, Cassilene, Uatani, dos quais eu sempre poderei contar.

Aos meus novos amigos que esta etapa me trouxe, dos quais quero sempre compartilhar a amizade, Jennifer, Izabela, Samira, Naiane, Jamile, Naedja, Renilde, Ceíça, Evandro, Renata, Isamara, Valdenice, Carol, Graciele, Larissa, Wilton e Werônica.

Aos meninos da graduação Uirá, Samy, Amanda, Danilo, Mariana, Naiana e Diego, por me ajudarem quando menos acharam que estavam ajudando. Em especial a Thaís Magalhães...estagiária queridaaa que tanto me ajudou.!

A minha Orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra Gisele Veneroni Gouveia, por tudo que aprendi com este trabalho, pela paciência, pelo esforço, e pela amizade sobretudo.

Ao Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa por ter aberto esta porta pra minha vida, ter me recebido e incentivado a gostar desta área que me “picou”.

Ao Prof. Dr. Wagner Pereira Félix por tão gentilmente ceder seu laboratório para conseguir concluir este trabalho, e também por ceder um pouco do seu tempo para me auxiliar quando precisei

A CODEVASF, pela gentileza de ceder os animais que foram utilizados neste experimento, em especial ao engenheiro Rozzanno e à Química Adriana Souza pela dedicação em ajudar na realização dos meus experimentos.

A Dra Adriana Ibelli, a qual ajudou fundamentalmente para a realização deste trabalho e que eu pude conhecer já no fim do curso.

Ao Prof. Dr. João José de Simoni Gouveia pelos auxílios de estrutura fornecidos pelo seu laboratório, e por outras contribuições.

Ao Prof. Dr. Fábio Nogueira Demarqui pela sua colaboração com o presente trabalho.

“Renda-se como eu me rendi.  
Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei.  
Não se preocupe em entender,  
Viver ultrapassa qualquer entendimento.”

Clarice Lispector

## RESUMO

Muitas são as causas de perdas econômicas na aquicultura, em meio a elas pode-se citar as doenças provocadas por micro-organismos. A contaminação do pescado por micro-organismos patogênicos pode levar a morte dos animais ou à lesões nos tecidos, tornando-os inapropriados para o consumo humano. Dentre as bactérias patogênicas destaca-se o gênero *Aeromonas* caracterizado por ser um patógeno oportunista que pode conter diversos fatores de virulência. Vários fatores ambientais podem afetar a produtividade de peixes e o desenvolvimento de doenças. No entanto, não se conhece a influência dos fatores ambientais sobre a expressão de genes de virulência em *Aeromonas spp.*. Deste modo os objetivos do presente estudo foram avaliar a influência dos fatores ambientais sobre o crescimento *in vitro*, a virulência *in vivo* e expressão de genes de virulência em *Aeromonas spp.*. Trinta e cinco isolados bacterianos de foram caracterizados por PCR quanto à presença de genes de virulência (aerolisina, hidrolipase, elastase, lipase, enterotoxina *ast*, flagelo lateral *laf* e flagelo polar *fla*). Seis isolados contendo genes de virulência foram submetidos a testes de crescimento *in vivo* em diferentes pontos de pH, temperatura e amônia e, também tiveram sua virulência *testada in vivo* em peixes submetidos às mesmas condições ambientais. Dois pontos de cada variável ambiental foram determinados para submissão dos isolados bacterianos a análise de expressão gênica dos fatores de virulência aerolisina, lipase e *fla*, mais frequentes na população bacteriana. A maioria dos genes foi detectada nos isolados analisados, com exceção do gene hidrolipase, sendo detectados em maior frequência os genes aerolisina, lipase e *fla*. Foi verificado que os três fatores ambientais influenciam o crescimento de *Aeromonas spp.* *in vitro* e, que diferentes pHs e concentrações de amônia influenciam a virulência bacteriana *in vivo*. O gene *fla* demonstrou ter sua expressão aumentada quando as bactérias são submetidas a maiores concentrações de amônia. A expressão do gene aerolisina não foi influenciada pelos fatores ambientais e o gene da lipase demonstrou ser pouco expresso *in vitro*. A expressão da virulência de *Aeromonas* aponta ser influenciada principalmente pelo imunocomprometimento do hospedeiro do que pelas condições abióticas a que está exposta no ambiente antes da infecção.

**Palavras chaves:** Fatores abióticos, Patógeno oportunista, Expressão gênica

## **ABSTRACT**

There are many causes of economic losses in aquaculture, among which we can mention the diseases caused by microorganisms. The fish contamination by pathogenic bacteria may lead animals to death or cause tissue injuries, making them unsuitable for human consumption. Among the pathogenic bacteria, it can be highlighted the *Aeromonas* genus characterized as an opportunistic pathogen that can contain several virulence factors. Many environmental factors can affect the fish productivity and the development of diseases. However, the influence of environmental factors on the expression of virulence genes in *Aeromonas* spp. still remains unknown. This study aimed to evaluate the influence of environmental factors on *in vitro* growth, on *in vivo* virulence and on the expression of virulence genes in *Aeromonas* spp.. Thirty-five bacterial isolations were classified by PCR according the presence of virulence genes (aerolysin, hidrolipase, elastase, lipase, *ast* enterotoxin, *laf* lateral flagellum and *fla* polar flagellum). Six isolations containing virulence genes were subjected to *in vitro* growth tests in different levels of pH, temperature and ammonia concentration and also had their virulence tested in fish subjects, under the same environmental conditions. Two points in each environmental condition were assigned so the bacteria isolations could be analyzed for gene expression of the three more frequent virulence factors in the population. Most of the genes were detected in the analyzed isolates, except for the hidrolipase gene. The more frequent genes were aerolysin, lipase and *fla*. It was found that three environmental factors influences the *in vitro* growth of *Aeromonas* spp., and that different pH and ammonia concentrations affect the bacterial virulence *in vivo*. The *fla* was upregulated gene when the bacteria are subjected to higher ammonia concentrations. The expression of aerolysin gene was not affected by environmental factors, and the lipase gene was little expressed *in vitro*. It was possible to conclude that the expression of the virulence genes in *Aeromonas* were more influenced rather by the immunocompromise of the host than by abiotic conditions that the bacteria is exposed to the environment before causing the infection.

**Keywords:** Abiotic factors, Opportunistic pathogen, Gene expression

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Sinais clínicos e alterações patológicas encontrados em peixes infectados com *Aeromonas*. A e C: dermatite em região de corpo e cabeça, respectivamente; B: dermatite necrosante; C: dermatite necrosante ulcerada; D: nadadeiras cerradas e presença de áreas de dermatite em todo corpo; E: líquido na cavidade abdominal; F: ascite evidenciada pelo aumento de volume abdominal. Fonte: Arquivo pessoal, (2014).....25

**Figura 2.** Curva padrão, utilizada no método do azul de indofenol, para detecção da amônia na água.

**Figura 3.** Eletroferograma obtido para análise dos isolados quanto sendo pertencentes ao gênero *Aeromonas* spp.....91

**Figura 4.** Placas contendo TSA (Trypticase Soy Agar) inoculadas com diferentes diluições de *Aeromonas* spp. para verificação da concentração de inóculo adequada para contagem de Unidades Formadoras de Colônias. Imagem A: diluição  $10^{-1}$ ; imagem B: diluição  $10^{-2}$ ; Imagem C: diluição  $10^{-3}$ ; Imagem D: diluição  $10^{-4}$ ; Imagem E: diluição  $10^{-5}$ ; Imagem F: diluição  $10^{-6}$ . As contagens realizadas nas diluições de  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  não foram registradas fotograficamente devido ao baixo número de UFC ( $< 30$ ). Fonte: Arquivo pessoal, (2014).....92

**Figura 5.** Isolado G15 submetido a diferentes pHs demonstrando o crescimento bacteriano. Letras, A, B, C, D e E representam os pHs 5,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10, respectivamente. Fonte: Arquivo pessoal, (2014).....92

**Figura 6.** Isolado G38 submetido a diferentes temperaturas. Placa A: Temperatura 28 °C, placa B: Temperatura 31 °C. Fonte: Arquivo pessoal, (2014).....92

**Figura 7.** Isolado G15 submetido a diferentes concentrações de amônia. Placa A: 0,9 mg/L, placa B: 1,2 mg/L, placa C: 0,6 mg/L, placa D: 0,1 mg/L e placa E 0,3 mg/L. Fonte: Arquivo pessoal, (2014).....93

**Figura 8.** Gel de agarose a 1,0 % das amostras de RNA referentes ao experimento de pH, evidenciando a integridade das duas subunidades ribossomais do rRNA 23S e 16S. As colunas na imagem referem-se aos isolados bacterianos testados.Sendo A: G38-ph7,0; B: G15-pH7,0; C: 67-pH-7,0; D:72b-pH7,0; E: A3-pH7,0; F: 10-pH7,0; G:67-pH10,0; H: 10-pH10,0; I: G38-pH10,0; J: G15-pH10,0; K: A3-pH10,0. (Fonte: Arquivo pessoal, 2015).....61

**Figura 9.** Gel de agarose a 1,0 % das amostras de RNA referentes ao experimento de temperatura, evidenciando a integridade das duas subunidades ribossomais do rRNA 23S e 16S. As colunas na imagem referem-se aos isolados bacterianos testados. Sendo: A: G38-T28; B : A3-T28; C: 67-T28; D: 10-T28; E: 72b-T28; F: G15-T28; G: 67-T31; H:72b-T31; I: 10-T31; J: A3-T31; K: G38-T31; L: G15-T31; M: 72b-pH10,0 (Fonte: Arquivo pessoal, 2015).....61

**Figura 10.** Gel de agarose a 1,0% das amostras de RNA do experimento de diferentes concentrações de amônia, evidenciando a integridade das duas subunidades ribossomais do rRNA 23S e 16S. As colunas na imagem referem-se aos isolados bacterianos testados com o tratamento aplicado. A: 67-0,1; B: G38-0,1; C: G15-0,1; D: A3-0,1; E: 10-0,1; F: 72b-0,1; G: 67-0,9; H: G38-0,9; I: G15-0,9; J: A3-0,9; K: 10-0,9. As imagens das colunas A e C, extravasaram durante a aplicação da amostra(Fonte: Arquivo pessoal, 2015).....62

<b>Figura 11.</b> Curva de eficiência dos iniciadores para o gene 16S rRNA.....	64
<b>Figura 12.</b> Curva de eficiência dos iniciadores para o gene RopD.....	65
<b>Figura 13.</b> Curva de eficiência dos iniciadores para o gene GyrA.....	65
<b>Figura 14.</b> Curva de eficiência dos iniciadores para o gene <i>fla</i> .....	66
<b>Figura 15.</b> Curva de eficiência dos iniciadores para o gene aerolisina.....	66
<b>Figura 16.</b> Curva de <i>melting</i> para o gene 16S rRNA.....	67
<b>Figura 17.</b> Curva de <i>melting</i> para o gene RopD.....	67
<b>Figura 18.</b> Curva de <i>melting</i> para o gene GyrA.....	68
<b>Figura 19.</b> Curva de <i>melting</i> para o gene <i>fla</i> .....	68
<b>Figura 20.</b> Curva de <i>melting</i> para o gene aerolisina.....	69
<b>Figura 21.</b> Gel de agarose com produtos oriundos da PCR em tempo real, para verificação da especificidade do iniciador através da presença de uma única banda correspondendo ao tamanho do iniciador desenhado no presente estudo. Sendo A: 16S rRNA (230pb), B: RopD (204pb), C: GyrA (214pb), D: aerolisina (203pb), E: <i>fla</i> (166pb).....	69
<b>Figura 22.</b> Resultado da análise de variabilidade de expressão dos genes constitutivos 16S rRNA, RopD e GyrA para a variável pH segundo ranking do <i>Coton EST Database</i> , que se baseia nas análises de Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder e Genorm. (Fonte: Arquivo pessoal, 2015).....	71

**Figura 23.** Resultado da análise de variabilidade de expressão dos genes constitutivos rRNA, RopD e GyrA para a variável temperatura segundo ranking do *Coton EST Database*, que se baseia nas análises de Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder e Genorm. (Fonte: Arquivo pessoal, 2015).....71

**Figura 24.** Resultado da análise de variabilidade de expressão dos genes constitutivos 16S rRna, RopD e GyrA para a variável amônia segundo ranking do *Coton EST Database*, que se baseia nas análises de Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder e Genorm. (Fonte: Arquivo pessoal, 2015).....72

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Iniciadores utilizados nas Reações em Cadeia da Polimerase para detecção dos genes de virulência nos isolados.....34

**Tabela 2.** Relação de isolados de *Aeromonas* spp. positivos para os genes de virulência.....49

**Tabela 3.** Isolados de *Aeromonas* spp. escolhidos com base na presença dos três genes de virulência mais frequentes.....52

**Tabela 4.** Resultados da análise que utilizou um modelo linear generalizado misto para verificar a influência do pH sobre o crescimento de *Aeromonas* spp. *in vitro*.....53

**Tabela 5.** Resultados da análise que utilizou um modelo linear generalizado misto para verificar a influência da temperatura sobre o crescimento de *Aeromonas* spp. *in vitro*.....54

**Tabela 6.** Análise utilizando um modelo linear generalizado misto para verificar a influência da concentração de amônia sobre o crescimento de *Aeromonas* spp. *in vitro*.....55

**Tabela 7.** Resultados da análise que utilizou um modelo de Equações de Estimção Generalizadas (GEE) para verificar a influência de diferentes pontos de pH sobre a mortalidade de Tilápias do Nilo inoculadas com *Aeromonas* spp.....57

**Tabela 8.** Resultados da análise que utilizou um modelo de Equações de Estimção Generalizadas (GEE) para verificar a influência de diferentes pontos de temperatura sobre a mortalidade de Tilápias do Nilo inoculadas com *Aeromonas* spp.....58

**Tabela 9.** Resultados da análise que utilizou um modelo de Equações de Estimção Generalizadas (GEE) para verificar a influência de diferentes pontos de concentração de amônia (mg/L) sobre a mortalidade de Tilápias do Nilo inoculadas com *Aeromonas* spp.....59

**Tabela 10.** Iniciadores delineados para realização da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.....63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase – Transcriptase Reversa

t – tonelada

O<sub>2</sub> – gás oxigênio

pH – potencial hidrogeniônico

°C – grau célsius

NH<sub>3</sub> - amônia

NH<sub>4</sub> – amônio

mg – miligrama

L – litro

CODEVASF – Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba

spp. – espécies

µL – microlitro

% - por cento

KDa – kilodawton

LAF – flagelo lateral

FLA – flagelo polar

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa  
cDNA – DNA complementar ao mRNA  
GyrA – subunidade da RNA polimerase  
PolIA – DNA polimerase I  
ftsZ – divisor de proteína celular  
fopa – membrana proteica  
ribC – biossíntese da proteína riboflavina  
16S rRNA – RNA ribossomal 16S  
uvrD – DNA helicase  
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
UNIVASF – Universidade Federal do Vale do São Francisco  
PE – Pernambuco  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
ast – enterotoxina citotônica  
HCl – ácido clorídrico  
KCl – cloreto de potássio  
mM – milimolar  
Taq DNA – Enzima Taq DNA polimerase  
μM – micromolar  
UV – ultravioleta  
V – voltagem  
mA – miliamperagem  
TBE – Tris ácido bórico EDTA  
TSA – Trypticase Soy Agar  
TSB – Trypticase Soy Broth  
OD – densidade óptica  
UFC – Unidade Formadora de Colônia  
g – grama  
NaOH – hidróxido de sódio  
GEE – Equação de Estimativa Generalizada  
TE – Tris, Ácido bórico  
g – força G

DEPC – Diethyl Pyrocarbonate

ng – nanograma

Ct – ciclo threshold

pb – par de base

## SUMÁRIO

	RESUMO	8
	ABSTRACT	9
	LISTA DE FIGURAS	11
	LISTA DE TABELAS	14
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
1.	INTRODUÇÃO	20
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1.	Aquicultura	20
2.2.	Fatores ambientais que afetam a piscicultura	22
2.2.1	pH	22
2.2.2	Temperatura	23
2.2.3.	Amônia	23
2.3.	Doenças que provocam perdas na piscicultura	24
2.4.	Caracterização do gênero <i>Aeromonas</i> spp.	25
2.5.	Genes relacionados a virulência em <i>Aeromonas</i> spp.	26
2.6.	Influência dos fatores ambientais sobre crescimento de <i>Aeromonas</i> spp.	28
2.7.	Deteção e quantificação de genes de virulência	29
3.	JUSTIFICATIVA	30
4.	OBJETIVOS	30
4.1.	Objetivo geral	31
4.2.	Objetivos específicos	31
5.	MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1.	Autorização do Comitê de Ética	31

<b>5.2.</b>	Fluxograma	31
<b>5.3.</b>	Local	32
<b>5.4.</b>	Isolados bacterianos	32
<b>5.5.</b>	Análise da presença de genes de virulência em <i>Aeromonas</i> spp.	33
<b>5.5.1.</b>	Detecção dos genes de virulência	33
<b>5.5.2.</b>	Análise dos produtos de PCR	35
<b>5.6.</b>	Escolha dos isolados a serem utilizados nos testes de crescimento bacteriano, de virulência bacteriana (segundo a análise de mortalidade de tilápia do Nilo inoculada com <i>Aeromonas</i> spp.) e, de expressão gênica	35
<b>5.7.</b>	Sequenciamento genético dos isolados	35
<b>5.8.</b>	Influência de fatores ambientais pH, temperatura e concentração de amônia sobre crescimento bacteriano <i>in vitro</i>	36
<b>5.8.1.</b>	Obtenção do inóculo bacteriano	36
<b>5.8.2.</b>	Determinação da influência de diferentes condições ambientais no crescimento de <i>Aeromonas</i> spp. <i>in vitro</i>	37
<b>5.8.2.1.</b>	Condições de cultivo <i>in vitro</i> para os diferentes pHs avaliados	38
<b>5.8.2.2.</b>	Condições de cultivo <i>in vitro</i> para as diferentes temperaturas avaliadas	38
<b>5.8.2.3.</b>	Condições de cultivo <i>in vitro</i> para as diferentes concentrações de amônia avaliadas	39
<b>5.8.2.4.</b>	Análise estatística	39
<b>5.9.</b>	Influência dos fatores ambientais pH, temperatura e concentração de amônia sobre a virulência de <i>Aeromonas</i> spp., segundo a mortalidade de tilápia do Nilo inoculadas com <i>Aeromonas</i> spp.	40
<b>5.9.1.</b>	Obtenção das diferentes temperaturas na água dos Aquários	41
<b>5.9.2.</b>	Obtenção dos diferentes pHs nos aquários	41
<b>5.9.3.</b>	Obtenção das diferentes concentrações de amônia nos aquários	41
<b>5.9.4.</b>	Análise estatística	42
<b>5.10.</b>	Análise de expressão gênica	43

<b>5.11.</b>	Escolha dos genes a terem suas expressões quantificadas	43
<b>5.12.</b>	Delineamento dos iniciadores	43
<b>5.13.</b>	Extração de RNA	44
<b>5.14.</b>	Quantificação e análise do RNA	45
<b>5.15.</b>	Síntese do cDNA	45
<b>5.16.</b>	Determinação da eficiência e da especificidade dos iniciadores	46
<b>5.17.</b>	Escolha do gene constitutivo	46
<b>5.18.</b>	RT-PCR em tempo real	46
<b>6.</b>	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
<b>6.1.</b>	Análise dos genes de virulência em isolados de <i>Aeromonas</i> spp.	47
<b>6.2.</b>	Sequenciamento	50
<b>6.3.</b>	Crescimento de <i>Aeromonas</i> spp. submetidas a diferentes pHs, temperaturas e concentrações de amônia	50
<b>6.4.</b>	Mortalidade de peixes inoculados com <i>Aeromonas</i> spp. e submetidos a diferentes pHs, temperaturas e concentrações de amônia	54
<b>6.5.</b>	Análise de expressão de genes de virulência em isolados de <i>Aeromonas</i> spp. submetidos a diferentes condições ambientais	58
<b>6.5.1.</b>	Extração de RNA e síntese de cDNA	58
<b>6.5.2.</b>	Iniciadores para a qPCR	61
<b>6.5.3.</b>	Especificidade das reações de qPCR	64
<b>6.5.4.</b>	Escolha do gene constitutivo	67
<b>6.5.5.</b>	Quantificação relativa por qPCR de genes de virulência em isolados de <i>Aeromonas</i> spp. submetidas a diferentes variáveis físicas e químicas da água	70
<b>7.0.</b>	CONCLUSÕES	73
<b>8.0.</b>	REFERÊNCIAS	74
<b>9.0.</b>	ANEXOS	90

## 1. INTRODUÇÃO

A carne de peixe constitui uma importante fonte de proteínas, lipídeos (como ácidos graxos ômega-3), além de vitaminas e minerais, oferecendo uma fonte equilibrada de nutrientes para a alimentação humana, sendo por muitas vezes o alimento mais consumido em muitas regiões do mundo (COSTA et al., 2013; CERDEIRA; RUFFINO; ISAAC, 1997).

No entanto, os peixes podem ser acometidos por várias doenças que podem culminar em perdas econômicas seja pela morte dos animais ou pelo desenvolvimento de lesões na carcaça, o que torna a carne inapropriada para o consumo humano. Um dos patógenos envolvidos com essa perda econômica é a bactéria *Aeromonas* (KUBITZZA, 2005).

*Aeromonas spp.* são caracterizadas por serem micro-organismos pertencentes a microbiota de muitos animais inclusive dos peixes. Podem possuir muitos fatores de virulência a exemplo da aerolisina, elastase e hidrolipase dentre outros, que contribuem para o sucesso do estabelecimento e multiplicação destas bactérias no hospedeiro (JANDA; ABBOTT, 2010).

O conjunto ambiente-hospedeiro é determinante para o estabelecimento da patogenia nas doenças provocadas por este patógeno, uma vez que é um micro-organismo oportunista. No entanto, há poucos estudos que descrevam como as variáveis ambientais podem influenciar a virulência de bactérias como a *Aeromonas spp.*

Uma forma de se avaliar quais fatores de virulência estão tendo sua expressão alterada frente a determinadas condições ambientais é por meio da quantificação do mRNA produzido pelo gene responsável pela codificação de determinado fator de virulência. Isso pode ser realizado pela técnica de RT (Transcriptase Reversa) PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Aquicultura

Os peixes constituem uma fonte de proteína animal importante para a alimentação humana em muitos países, chegando a cerca de 17% da média de consumo de proteína animal per capita no mundo. Sua produção, assim como a

atividade extrativista, geram benefícios sociais e econômicos (FAO, 2013; CERDEIRA; RUFFINO; ISAAC, 1997).

A aquicultura mundial destaca-se por contribuir na produção de produtos de origem animal, prova disso é que no ano de 2010 este setor produziu 60 milhões de toneladas de pescado, sendo a China o maior produtor mundial e o Brasil ficando na 23<sup>a</sup> posição (FAO, 2013).

No ano de 2010 a produção de pescado no Brasil foi de 1.264.765 t, sendo a aquicultura continental responsável por 31,2% deste total e a piscicultura continental representando 82,3% da produção nacional. A região nordeste apresentou a maior produção de pescado do país, chegando a 410.532 t neste mesmo ano (MPA, 2012), com taxa de crescimento de 10,8% entre 2000 e 2010 (FAO, 2013). Os estados da Bahia e Pernambuco produziram no ano de 2010 cerca de 114,000 e 20,000 toneladas de pescado, sendo grande parte deste proveniente da aquicultura continental, contribuindo para a balança comercial de pescado do Brasil.

Várias são as espécies pescadas e criadas no território nacional com importância comercial, dentre elas podem se destacar o curimatã, tambaqui, pacu, matrinxã, pirarucu, surubim, carpa, truta, jundiá e tilápia, sendo esta última uma das espécies mais produzida no Brasil (IBAMA, 2007; CODEVASF, 2013). A tilapicultura no Brasil produziu entre os anos de 1995 e 2009 cerca de 121.000 toneladas, com uma taxa de crescimento ao ano de 17% (KUBITZZA, 2011).

A criação de peixes pode ser realizada de maneira extensiva, semi-intensiva e intensiva, sendo que essa última se caracteriza por maior emprego de tecnologia, monocultivo, elevada densidade de animais e maior controle de alimentação e das variáveis ambientais quando comparada aos demais sistemas (CREPALDI et al., 2006; PEIXOTO et al., 2010). No Brasil são mais comuns os sistemas de produção em viveiros de forma extensiva ou semi-intensiva em tanques escavados de chão, com destaque ao sistema semi-intensivo em tanques redes no baixo médio São Francisco, na barragem de Xingó, por cooperativas ligadas ao cultivo da tilápia (CREPALDI et al., 2006).

Condições de estresse impostas aos animais como alta densidade, alterações na qualidade da água como diminuição da concentração de O<sub>2</sub> e aumento na concentração de amônia podem propiciar o desenvolvimento de doenças infecciosas (FIGUEIREDO; LEAL, 2008).

Estima-se que no mundo cerca de US\$ 9,0 bilhões por ano são perdidos em consequência de doenças em peixes (KUBITZZA, 2009). Na Costa Rica, os prejuízos diretos por doenças infecciosas chegaram a 2,5 milhões de dólares em 2004. No Brasil, há escassez de dados quanto à dimensão das perdas provenientes de doenças infecciosas, mas ao menos 5% dos peixes com tamanho de mercado morrem antes de completar o ciclo produtivo, sem considerar os alevinos e juvenis, estas perdas podem ser provenientes das doenças, o que representa uma estimativa de cerca de R\$ 10 milhões em prejuízos econômicos (KUBITZZA, 2005).

## **2.2. Fatores ambientais que afetam a piscicultura**

Sabe-se que o pH, a temperatura e a concentração de amônia na água influenciam o desenvolvimento de peixes (FERREIRA et al., 2001; ROJAS et al., 2001; MOURA et al., 2007). Rojas et al., (2001) observaram efeito significativo para o crescimento de larvas de Curimbatá (*Prochilodus lineatus*) submetidas a diferentes condições de temperatura e alcalinidade, assim como Moura et al., (2007) que verificaram influência da temperatura sobre o metabolismo e desempenho de tilápias do Nilo.

### **2.2.1. pH**

O pH é uma das variáveis mais importantes da qualidade da água (UNESCO, 1983). Body (1990) cita que os valores de pH da água adequados à aquicultura estão entre 6 e 9, sendo que valores abaixo de 4,0 ou acima de 11,0 causam mortalidade dos peixes além disso o mesmo autor menciona que fatores como o fotoperíodo e a concentração de matéria orgânica afetam este parâmetro. El-Sherif e El-Feky (2009) mencionam que as tilápias quando expostas a pHs acima de 8,0 e abaixo de 7,0 apresentam redução de crescimento, redução do ganho de peso e redução do consumo alimentar.

Mercante et al., (2007), relatam que o pH da água apresenta variação quanto ao fotoperíodo sendo mais elevado durante o dia do que durante a noite e início da manhã devido a fotossíntese que ocorre nos ambientes aquáticos. Em sistemas de grande produtividade, onde há maior presença de matéria orgânica, há tendência de geração de algas com aumento da alcalinidade do ambiente aquático, o que deve ser uma preocupação (KUBITZZA, 2000). E, quando expostas a baixo pH as tilápias

apresentam sinais de produção de muco em excesso, inflamação nas brânquias e necrose (KUBTIZZA, 2000).

### **2.2.2. Temperatura**

A temperatura pode influenciar de diversas maneiras a piscicultura seja na redução do consumo alimentar, disfunções reprodutivas ou aumento na susceptibilidade a doenças (SUN et al., 1992; JUSTI et al., 2005; KUBTIZZA, 2005).

As tilápias são peixes tropicais de origem africana, apresentando uma zona de conforto térmico que varia entre 27 e 32 °C, sendo que à temperatura de 18 °C o sistema imunológico dos peixes pode se encontrar deprimido (OSTRENSKI; BOEGER, 1998). Sun, Chen e Chang (1992) demonstraram que tilápias quando submetidas a temperaturas baixas elevam as taxas de cortisol, e aumento de glicose sanguínea, o que estaria diretamente relacionado com o estresse predispondo assim à doenças.

As alterações provocadas por temperatura podem ser demonstradas em três estágios. Em um primeiro estágio ocorre a liberação de catecolaminas ativando o sistema neuroendócrino com resposta conseguinte do sistema corticotropina-interrenal, secundariamente ocorrem alterações hematológicas, osmóticas com metabólitos e catabólitos no sangue, e por último uma terceira etapa que inclui diminuição de crescimento, redução de fertilidade e o aumento da susceptibilidade à doenças (MAZEAUD et al., 1977; LUSHCHAK, 2011).

### **2.2.3. Amônia**

Comumente encontrada em ambientes aquáticos, a amônia pode ser proveniente da degradação da matéria orgânica e a excreção de peixes teleósteos e, pode ser utilizada por micro-organismos como fonte de energia (LANGER; VARGAS, 2004; KUÇUK, 2014). Altas concentrações de amônia na água podem causar diminuição de crescimento, alterações fisiológicas e morte aos animais (BODY, 1990; WEISS; ZANIBONI-FILHO, 2009).

A amônia existe sob duas formas em ambientes aquáticos, a amônia não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) que é tóxica para os peixes e a amônia ionizada ( $\text{NH}_4$ ) que não apresenta toxidez aos peixes (KUÇUK, 2014), sendo que a toxidez é dependente de outros fatores como a temperatura e o pH da água (HARGREAVES; TUCKER, 2004).

Em sistemas de criação com maior controle sobre a qualidade da água as concentrações de amônia dificilmente chegam as doses letais, porém podem causar retardo no crescimento dos animais e maior susceptibilidade a doenças (HARGREAVES; TUCKER, 2004). A concentração de amônia total na água entre valores de 0,4 e 1,0 mg/L é considerada aceitável, já os níveis de amônia não ionizada não deve ultrapassar 0,5 mg/L (LANGER; VAGAS, 2004). Segundo El-Sheby e Gab (2011) e El Sherif e El-Feky (2008), a concentração de amônia em sistemas de criação de peixes não deve ultrapassar o limite de 0,1mg/L a fim de não causar interferências como queda de produção.

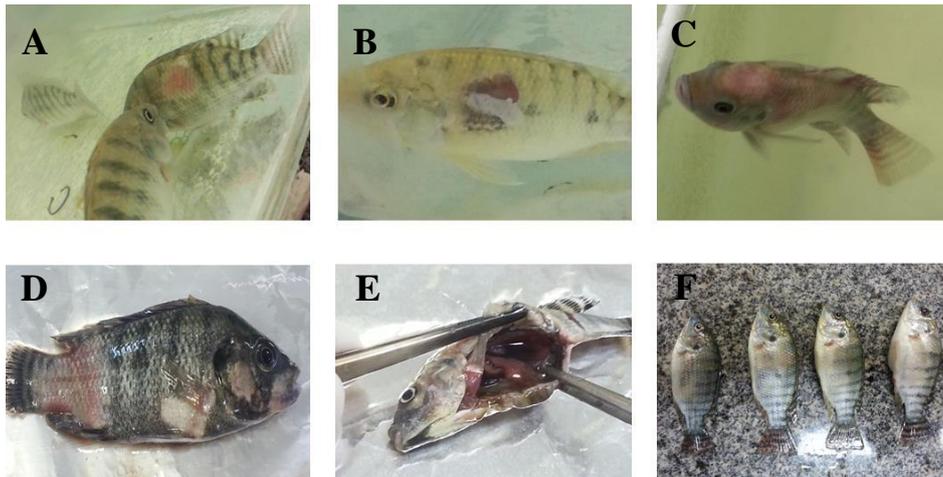
Alterações nos ambientes aquáticos de piscicultura podem tornar os peixes mais sensíveis a contrair doenças (GAZZOLA, 2003).

### **2.3. Doenças que provocam perdas na piscicultura**

Os peixes podem ser afetados por um grande número de patologias causadas por protozoários, vírus, fungos, parasitas e bactérias que podem ocasionar a morte do animal ou lesões nos tecidos, tornando o pescado inapropriado para a alimentação humana (PAVANELLI et al., 2002).

Dentre as principais enfermidades infecciosas comuns nos sistemas de piscicultura pode-se mencionar as causadas pelo *Flavobacterium columnare* que é capaz de causar alterações na pele como lesões acinzentadas ou amareladas que podem progredir para ulcerações além de causar alta mortalidade (DURBOROW et al., 1988), pelo *Streptococcus agalactiae* que ocasiona ulcerações em toda superfície corporal (CODEVASF, 2013), pelas *Pseudomonas spp.* que ocasionam sinais como peritonite, e pelas *Aeromonas* (FIGUEIREDO; LEAL, 2008; CODEVASF, 2013). Dentre as enfermidades bacterianas de organismos aquáticos a septicemia ocasionada por *Aeromonas spp.* (KUBITZZA, 2005) vem sendo amplamente estudada devido ao caráter zoonótico deste patógeno e por causar perdas econômicas para piscicultura.

As infecções por *Aeromonas spp.* em peixes são caracterizadas por apresentarem edema abdominal, dermatites e, úlceras profundas, são também comuns em nadadeiras e cabeça (Figura 1), além da presença de exoftalmia (CODEVASF, 2013). São amplamente distribuídas em ambientes aquáticos como rios, lagos e tanques de piscicultura sendo consideradas da microbiota destes ambientes (ABEYTA et al., 1990).



**Figura 1.** Sinais clínicos e alterações patológicas encontrados em peixes infectados com *Aeromonas*. A e C: dermatite em região de corpo e cabeça, respectivamente; B: dermatite necrosante; C: dermatite necrosante ulcerada; D: nadadeiras cerradas e presença de áreas de dermatite em todo corpo; E: líquido na cavidade abdominal; F: ascite evidenciada pelo aumento de volume abdominal. Fonte: Arquivo pessoal, (2014).

#### 2.4. Caracterização do gênero *Aeromonas* spp.

As *Aeromonas* são organismos emergentes encontrados em diversos tipos de ambientes como água, leite, solo, alimentos de origem animal processados e não processados, congelados, resfriados e descongelados além de vegetais, podendo resistir a diferentes condições ambientais, além de fazer parte da microbiota de animais como peixes, anfíbios e répteis (PALUMBO et al., 1989; SEM; RODGERS, 2004; RODRIGUES, 2007; SANTOS et al., 2010; CERESER et al., 2013).

As *Aeromonas* pertencem à família *Aeromonadaceae*, sendo que de acordo com Garrity et al., (2004) esta família compreende os gêneros: *Aeromonas*, *Oceanimonas* e *Tolumonas*. Dentro do gênero *Aeromonas* foram descritas as espécies *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronni*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoftii*. Sendo que as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii* e *A. schubertii* são consideradas de importância clínica (FRANZOLIN, 2004; NAM; JOH, 2007; MARQUES, 2011).

As *Aeromonas* são bacilos gram negativos curvos ou retos de 0,5- 0,8 x 3,0- 4,0  $\mu\text{m}$ , anaeróbios facultativos, catalase-positivos e possuem motilidade flagelar com exceção da espécie *A. salmonicida*. São fermentadores de glicose, com crescimento ideal à 28 °C, mas podem crescer entre 25 e 37 °C. Podem ser cultivados em ágar MacConkey à 27 °C por 24 horas em pH 7,0 ou levemente

alcalino. As *Aeromonas* podem ser encontradas sob a forma de vida livre ou associadas a animais como répteis e peixes (QUINN et al., 1994; ISONHOOD; DRAKE, 2002). São comuns em água doce, esgoto e solos, em sistemas de distribuição de água potável e leite. A concentração deste micro-organismo nestes ambientes aumenta em função da maior quantidade de matéria orgânica presente (FRANZOLIN, 2004).

Ocasionalmente as *Aeromonas* spp. causam infecções em humanos podendo levar a quadros de septicemia e diarreia em crianças e pessoas imunocomprometidas de todas faixas etárias, além de intoxicação alimentar como no caso da “diarreia do viajante” (QUINN et al., 1994; FRANZOLIN, 2004).

Diferentes condições de estresse entre os peixes podem fazer com que diferentes níveis de patogenicidade sejam verificados nos animais, como os referentes à qualidade da água, às práticas de cultivo, à alimentação e às interações biológicas. Grande parte dos micro-organismos causadores de patologias pode fazer parte da microbiota natural do animal, como a *Aeromonas hydrophila* que está presente em peixes de água doce e é considerada um patógeno oportunista (QUINN et al., 1994; OBA et al., 2009; SILVA, 2010).

Kirov (1993) observou que linhagens de *Aeromonas* capazes de produzir fatores de citotoxicidade como produção de enterotoxinas eram contaminantes de água e alimentos o que representa um risco a saúde humana. Kozinska et al., (2002) conseguiram isolar 34 isolados de *Aeromonas* spp. a partir de carpas doentes e saudáveis além de amostras de água. Oliveira et al., (2013) conseguiram isolar *Aeromonas* spp. a partir de pele de peixes não comercializados e de fígado de peixes comercializados em uma frequência de 33%.

## **2.5. Genes relacionados a virulência em *Aeromonas* spp.**

As *Aeromonas* spp. produzem fatores de virulência que estão envolvidos com a colonização, estabelecimento e replicação bacteriana nos tecidos do hospedeiro causando lesões e até morte (VILCHES et al., 2004).

As *Aeromonas* produzem vários tipos de proteases que provocam danos aos tecidos colaborando com o estabelecimento da infecção (FRANZOLIN, 2004). Entretanto a virulência é considerada multifatorial e, entre os fatores de patogenicidade pode-se mencionar aqueles produtos extracelulares biologicamente ativos como citotoxinas, enterotoxinas, hemolisina, proteases, leucocidina,

fosfolipases, endotoxinas, elastase, diástase, lisina oxidase, DNase e gelatinase (QUINN et al., 1994; FRANZOLIN, 2004). Ainda pode se citar estruturas da célula como pili, proteínas de membrana externa, flagelos, lipopolissacarídeos e cápsula proteica (JANDA, 1991).

Vários genes já foram descritos como relacionados à virulência de *Aeromonas* spp. com mecanismo de participação no sistema de secreção tipo III, podendo-se mencionar os genes para aerolisina ou enterotoxina citotóxica com potencial de causar atividade hemolítica, citotóxica e enterotóxica e os genes *ast* e *alt* relacionados à produção de citotoxinas enterotóxicas, contudo estas não causam degeneração das vilosidades intestinais. Outras moléculas produzidas por este sistema incluem as proteases como a elastase (GRIM et al., 2013).

O gene *ast* está relacionado com a produção de uma cadeia polipeptídica de 44 KDa formando uma enterotoxina citotônica secretada pelo sistema tipo III, este mecanismo causa em células hospedeiras edema intersticial em roedores e também dos níveis de amp cíclico nas mucosas celulares (CHOPRA; HOUSTON, 1999).

O gene codificante da toxina aerolisina é responsável por expressar informações para síntese de uma proteína de 55 KDa com potencial de causar hemólise (exotoxina) e participar da instalação de processos infecciosos septicêmicos, além de degeneração das criptas e vilosidades intestinais (CHACKRABORTY et al., 1987; CHOPRA; HOUSTON, 1999). O mecanismo de virulência relacionado a proteína codificada por esse gene consiste em formar poros na membrana da célula hospedeira. De acordo com Guerra et al., (2007) e Marques (2011), isolados de *Aeromonas* spp. provindos de surtos de diarreia em pessoas comprovam a associação da presença deste gene aos quadros de diarreia.

A elastase uma proteína de 38 KDa sintetizada através da expressão do gene *ahpB*, é um dos fatores mais importantes da virulência em *Aeromonas* spp. contribuindo com a capacidade elastolítica da célula bacteriana (CASCÓN et al., 2000). Esta proteinase atua quebrando ligações peptídicas entre aminoácidos e proteínas causando danos aos tecidos, a exemplo da interrupção da formação de imunoglobulinas, o que diminui assim a atividade do sistema mononuclear fagocítico implicando na patogenia da infecção (HORWITZ et al., 1999).

A lipase é uma enzima de 67 KDa expressa pelo gene *lip*, e acredita-se que a lipase produzida pela *Aeromonas* spp. esteja relacionada com alterações nas membranas celulares das células hospedeiras interferindo na resposta imune

(ANGUITA et al., 1993), além de atuar na manutenção e proliferação da bactéria, interferindo em cascatas imunológicas do hospedeiro como na liberação de cinases, sem provocar um dano tecidual direto (SCHMIEL; MILLER, 1999).

De acordo com Anguita et al. (1993) a mais alta atividade enzimática da lipase em *Aeromonas* spp. foi detectada a um pH de 7,2 e temperatura de 37 °C. De acordo com Cascón et al., (1996) o gene hidrolipase também possui atividade de produção de uma enzima com atividade lipolítica do mesmo grupo das lipases.

Canals et al., (2006) demonstraram a presença do gene flagelar lateral (*laf*) em *Aeromonas hydrophila* AH-3, sendo este fator de virulência relacionado a aderência das bactérias e formação de biofilme. O gene *laf* tem sido relacionado à virulência pela expressão de flagelos (PABLOS et al., 2010).

O gene *fla* é responsável pela expressão da estrutura do flagelo polar em *Aeromonas*, apresentando como principal função a motilidade da bactéria em meio aquoso constituindo assim um importante meio de fuga do sistema imunológico além de contribuir com a formação de biofilme (KIROV, 1993; SANTOS et al., 2010).

O biofilme é um mecanismo de virulência bacteriana caracterizado como um acúmulo de bactérias embebidas em uma matriz de polissacarídeos produzidos pelos próprios micro-organismos. Essa estrutura fica firmemente aderida a uma superfície constituindo assim um mecanismo de aderência, colonização e proteção destes organismos (KIROV et al., 2002). A medida que a densidade de bactérias aumenta em uma superfície, moléculas auto-indutoras acumulam-se levando a expressão de vários genes específicos que podem estar relacionados a fatores de virulência (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

## **2.6. Influência dos fatores ambientais sobre crescimento de *Aeromonas* spp.**

Sabe-se que alguns fatores ambientais como concentração de sais, pH e atmosfera podem influenciar a sobrevivência da bactéria em alimentos a baixas temperaturas (PALUMBO et al., 1989). Por ser uma bactéria aeróbia, a concentração de oxigênio também determina maior deterioração do meio de cultivo e crescimento das *Aeromonas* (PALUMBO et al., 1988).

Resultados têm sido demonstrados que isolados de *Aeromonas* podem apresentar diferentes níveis de atividade patogênica, correlacionados a fatores de virulência como produção de toxinas e motilidade, a depender de condições

ambientais tais como temperatura (OLIVIER et al., 1981), pH e concentração de sais *in vitro* (DELAMARE et al., 2000).

## 2.7. Detecção e quantificação de genes de virulência

Genes relacionados com expressão de fatores de virulência podem ser detectados em isolados bacterianos pela amplificação do DNA por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) por ser uma técnica altamente sensível e específica (CASCÓN et al., 1996). Esta técnica molecular tradicional permite a identificação de genes de virulência em isolados bacterianos através da utilização de iniciadores específicos para uma determinada região genômica (MORENO; AGUDELO-FLÓREZ, 2010).

A técnica consiste na amplificação de fragmentos de um DNA alvo em ciclos que se repetem em três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. Para que a reação aconteça é necessária a presença de iniciadores específicos para o gene a ser estudado, desoxiribonucleotídeos, de um tampão contendo co-fatores como o  $MgCl_2$  e, da enzima DNA Polimerase (EISENSTEIN, 1990).

Entretanto a PCR convencional não fornece a possibilidade de quantificação de material genético transcrito. Uma variante dessa técnica é PCR em tempo Real (qPCR), que além de ser utilizada para detecção de genes de virulência, a mesma permite sua quantificação, permitindo o monitoramento em tempo real da amplificação por meio da captura de intensidade de um fluoróforo que é adicionado à reação (MELO, 2006). Segundo o mesmo autor a qPCR permite a quantificação da expressão de um dado gene por meio da quantificação de mRNA através da análise do cDNA (DNA complementar) que é sintetizado através da técnica de RT-PCR (Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase).

A qPCR possui duas vertentes: quantificação absoluta e quantificação relativa (DECOSTE; GADKAR; FILION, 2011). A quantificação absoluta baseia-se na comparação da amplificação da amostra de interesse com um padrão cujo número de moléculas é conhecido (curva padrão). Esse tipo de análise geralmente é utilizada para detecção e quantificação de patógenos como vírus (BUSTIN, 2000; PFAFFL, 2004) e bactérias. Trakhna et al., (2013) utilizaram a qPCR para quantificação de *Aeromonas hydrophila* como método alternativo a técnica de membrana filtrante. Já a quantificação relativa baseia-se na comparação da amplificação do gene avaliado com um gene constitutivo (PFAFFL et al., 2004).

O primeiro passo para realização da PCR em tempo real é o delineamento dos iniciadores específicos para o gene de interesse, que não sejam auto complementares e que não formem grampos (D'HAENE; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010).

Para realização da qPCR relativa o emprego do gene constitutivo se faz indispensável. Genes constitutivos são aqueles que não possuem variação nos níveis de transcritos se expostos às condições experimentais (SAVLI et al., 2003).

A qPCR vem sendo amplamente usada no estudo da expressão gênica em micro-organismos, como no trabalho realizado por DeCoste et al., (2011) que avaliaram a influência de certos compostos de plantas sobre a expressão gênica de alguns genes de *Pseudomonas* sp.. Um estudo realizado por Brudal et al. (2013) utilizando a bactéria da espécie *Franciella* spp. analisou vários genes constitutivos (genes da DNA girase (*gyrA*), subunidade da RNA polimerase (*RpoD*), DNA polimerase I (*polA*), divisor de proteína celular (*ftsZ*), membrana protéica (*fopA*), biossíntese da proteína riboflavina (*ribC*), RNA ribossomal 16S (16S rRNA), DNA helicase (*uvrD*) para apontar qual seria o melhor quando estes eram submetidos a diferentes condições de suplementação de Ferro e, obtiveram melhores resultados para o *RpoD*, 16S rRNA, *fopA* e o *GyrA*. Fato que demonstra a importância de se testar vários genes constitutivos na realização desse tipo de estudo.

### **3. JUSTIFICATIVA**

*Aeromonas* spp. é uma bactéria que pode possuir muitos fatores de virulência que influenciem sua patogenicidade (tanto em animais quanto em humanos). Sabe-se que dentre as diversas causas de perdas econômicas na piscicultura, as doenças provocadas por estas bactérias devem ser ressaltadas, uma vez que podem ser letais para os peixes ou podem afetar a qualidade da carne dos mesmos pela presença de lesões. Sabe-se que esses patógenos são oportunistas e atacam peixes debilitados ou sob condições de estresse, mas pouco se sabe sobre o início do processo de infecção influenciado por parâmetros ambientais a que esses organismos estão submetidos. Desta maneira devido ao pouco conhecido sobre a expressão dos genes de virulência deste patógeno sob diferentes condições ambientais, é necessária a realização de trabalhos que investiguem esse aspecto.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito do pH, temperatura e concentração de amônia sobre o crescimento e virulência de *Aeromonas* spp., assim como sobre a expressão de alguns genes de virulência.

#### **4.2. Objetivos específicos**

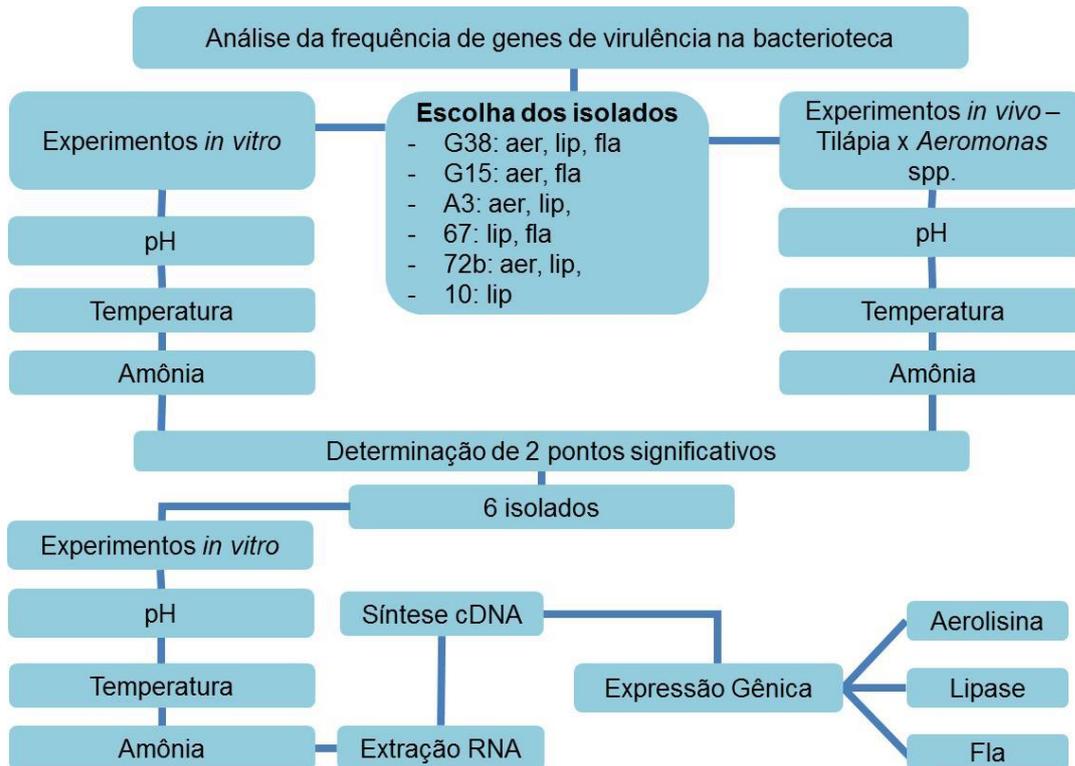
1. Identificar a presença de genes de virulência (aerolisina, hidrolipase, elastase, lipase, *ast*, *laf* e *fla*) em isolados de *Aeromonas* spp.;
2. Avaliar o efeito de pH, temperatura e concentração de amônia sobre o crescimento *in vitro* de *Aeromonas* spp. e sobre a virulência dessa bactéria, segundo a mortalidade de tilápia do Nilo inoculada com isolados de *Aeromonas* spp. contendo os genes de virulência;
3. Avaliar o efeito do pH, temperatura e concentração de amônia sobre a expressão de três genes de virulência identificados em isolados de *Aeromonas* spp.;
4. Determinar dentre os fatores pH, temperatura ou concentração de amônia qual apresenta maior influência sobre a expressão de determinados fatores de virulência.

### **5. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **5.1. Autorização do Comitê de ética**

Esse projeto foi realizado segundo autorização da comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco sob o Protocolo nº 0001/111213.

#### **5.2. Fluxograma**



### 5.3. Local

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal no Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) de Petrolina/PE/Brasil.

### 5.4. Isolados bacterianos

No presente estudo foram utilizados isolados de *Aeromonas* spp. que se encontram armazenados na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal. Esses isolados são oriundos da Barragem de Sobradinho/BA e do Projeto Bebedouro da CODEVASF/PE. Foram coletadas amostras de peixes obtidas de rim, tegumento, intestino e lesões de tilápias do Nilo e pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*) com e sem sintomatologia clínica, isolados entre os anos de 2010 e 2012.

## 5.5. Análise da presença de genes de virulência em *Aeromonas* spp.

### 5.5.1. Detecção dos genes de virulência

Foram genotipados 35 isolados de *Aeromonas* spp. para os genes aerolisina, hidrolipase, elastase, lipase, *ast*, *laf* e *fla* relacionados a virulência de *Aeromonas* spp. por PCR seguida de eletroforese em gel de agarose.

Os DNAs desses isolados foram extraídos por um método de choque térmico (SÁ et al., 2013).

Os iniciadores utilizados nas PCRs estão descritos na Tabela 1. Amostras negativas foram analisadas em duplicata.

**Tabela 1.** Iniciadores utilizados nas Reações em Cadeia da Polimerase para detecção dos genes de virulência nos isolados.

Gene	Iniciador	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento em pares de bases	Referência
Aerolisina	<i>aer</i> -F <i>aer</i> -R	CCTATGGCCTGAGCGAGAAG CCAGTTCAGTCCCACCACT	431	(HOWARD et al., 1987)
Hidrolipase	<i>Lip</i> -F <i>Lip</i> -R	AACCTGGTTCCGCTCAAGCCGTTG TTGCTCGCCTCGGCCAGCAGCT	760	(CASCÓN et al., 1996)
Elastase	<i>ahyB</i> -F <i>ahyB</i> -R	ACACGGTCAAGGAGATCAAC CGCTGGTGTGGCCAGCAGG	540	(SEN, 2005)
Lipase	<i>pla/lip</i> -F <i>pla/lip</i> -R	ATCTTCTCCGACTGGTTCGG CCGTGCCAGGACTGGGTCTT	383 – 389	(SEN, 2005)
Enterotoxina ( <i>ast</i> )	<i>ast</i> -F <i>ast</i> -R	TCTCCATGCTTCCCTTCCACT GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG	331	(SEM; RODGERS, 2004)
Flagelo lateral ( <i>laf</i> )	<i>laf</i> _F <i>laf</i> _R	GGTCTGCGCATCAACTC GCTCCAGACGGTTGCTG	550	(GAVIN, 2003)
Flagelo polar ( <i>fla</i> )	<i>fla</i> F <i>fla</i> R	TCCAACCGTYTGACCTC GMYTGTTGCGRATGGT	608	(SANTOS et al., 2010)

Para o gene aerolisina, o mix para PCR continha tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50mM de KCl), 2,00mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dNTPs, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 0,24 µM de iniciadores e 4,0 µL de DNA molde não quantificado, totalizando um volume total de 25 µL. A PCR se iniciou com uma fase de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, depois o anelamento a 55,5 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Ao final de 35 ciclos houve uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Para a amplificação do gene hidrolipase o mix da reação foi composto por tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50 mM de KCl), 2,0 mM de  $MgCl_2$ , 0,4 mM de dNTPs, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 0,4  $\mu M$  de iniciadores e 4,0  $\mu L$  de DNA molde não quantificado. Totalizando um volume total de 25  $\mu L$ . As reações de PCR possuíram as seguintes etapas: Desnaturação inicial a 94 °C por um minuto, anelamento do iniciador a 62°C por 1 minuto, e extensão do DNA a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, ao fim de 40 ciclos foi realizada uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

O gene elastase foi amplificado em uma reação contendo tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50 mM de KCl), 1,2 mM de  $MgCl_2$ , 0,4 mM de dNTPs, 1,5 U de Taq DNA polimerase, 0,4  $\mu M$  de iniciadores e 4,0  $\mu L$  de DNA molde não quantificado, totalizando um volume total de 25  $\mu L$ . Sendo realizadas as seguintes etapas: desnaturação inicial de 94 °C por 1 minuto, anelamento do iniciador a 58 °C por 30 segundos, extensão do DNA a 72 °C por 2 minutos, depois de 40 ciclos foi realizada uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Para amplificar o gene lipase, a reação de PCR foi composta por tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50 mM de KCl), 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de dNTPs, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 0,2  $\mu M$  de iniciadores e 4,0  $\mu L$  de DNA molde não quantificado. Totalizando um volume total de 25  $\mu L$ . A ciclagem foi: Desnaturação inicial à 95 °C por 15 minutos, seguida de 30 ciclos com temperatura de desnaturação de 95 °C por 45 segundos, anelamento do iniciador a 55 °C por 45 segundos, alongamento da fita de DNA a 72 °C por 1 minuto e um ciclo final de 72 °C por 7 minutos.

Para a caracterização do gene *ast* a reação de PCR contou com um mix composto por tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50 mM de KCl), 2 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de dNTPs, 1,0  $\mu M$  de iniciadores, 2,5 U de Taq polimerase e 5  $\mu L$  de DNA molde não quantificado. As etapas de PCR para esta reação foram de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, com 25 ciclos compostos por desnaturação a 95 °C por 25 segundos, anelamento do iniciador a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto.

Para a caracterização da presença do gene *laf* a reação constou de tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50 mM de KCl), 2 mM de  $MgCl_2$ , 0,4 mM de dNTPs, 0,4  $\mu M$  de cada iniciador, 2,5 U de Taq polimerase e 10  $\mu L$  de DNA molde não quantificado. Os ciclos de amplificação constaram de uma desnaturação

inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento por 45 segundos a uma temperatura de 56 °C e extensão a 72 °C por 90 segundos. Em seguida, houve uma extensão final a uma temperatura de 72 °C por 10 minutos.

Para identificação do gene *fla* o mix de PCR foi composto por um tampão de enzima 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5 50 mM de KCl), 2 mM de dNTPs, 0,8 µM de iniciadores, 2,5 U de Taq DNA polimerase e 5 µL de DNA molde não quantificado. As etapas de PCR possuíram as mesmas condições utilizadas para a amplificação do gene *ast*.

### **5.5.2. Análise dos produtos de PCR**

Os resultados das PCRs foram visualizados através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % e observados sobre luz UV em um transluminador, sendo as imagens capturadas por um fotodocumentador para arquivamento. As corridas aconteceram a 110 V e 90 mA durante duas horas. O tampão de corrida utilizado foi o TBE 1X (90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico e 2 mM EDTA pH 8,0).

### **5.6. Escolha dos isolados a serem utilizados nos testes de crescimento bacteriano, de virulência bacteriana (segundo a análise de mortalidade de tilápia do Nilo inoculada com *Aeromonas* spp.) e, de expressão gênica**

Segundo os resultados da verificação da presença dos três genes de virulência mais frequentes, verificados segundo as análises de PCRs anteriormente descritas, foram escolhidos seis isolados de *Aeromonas* spp. para serem utilizados nos testes de crescimento bacteriano, análise de virulência (segundo a mortalidade de tilápia do Nilo) e de expressão gênica.

Para isso, foi considerada a presença de três genes, sendo um gene relacionado com a necrose tecidual no processo de infecção (aerolisina), um gene relacionado a alterações nas membranas das células hospedeiras (lipase) e um gene relacionado a produção de biofilme (*fla*). Os seis isolados continham pelo menos dois desses genes.

### **5.7. Sequenciamento genético dos isolados**

Após escolha dos seis isolados de *Aeromonas* spp. estes, foram sequenciados para confirmação do gênero *Aeromonas* spp.

Para isto os seis isolados foram replicados em meio de cultura TSA, incubados a temperatura de 28 °C durante 24 horas em estufa bacteriológica para extração de DNA genômico através da técnica de choque-térmico (SÁ, et al 2013).

O DNA bacteriano foi amplificado por PCR, através da utilização dos iniciadores universais de procariotos 13R e 516F (FREDERICKS; RELMAN, 1998). A reação constou de tampão de enzima 1x (10 mM de Tris-HCl pH 8,5 50 mM de KCl), 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,16 mM de dNTPs, 0,4 mM de cada iniciador, 2,5 U de Taq polimerase e 2 µL de DNA molde não quantificado em um volume final de 20 µL. Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento específico do iniciador a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, sendo que no final houve uma extensão final a uma temperatura de 72 °C por 7 minutos.

Após realização da PCR, as amostras foram analisadas através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % à 100 V, 110 mA durante 2 horas e o gel foi corado com brometo de etídeo. As bandas foram então recortadas e purificadas com auxílio do Kit PureLink™ (Invitrogen®) e submetidas ao sequenciamento em laboratório particular. Os eletroferogramas foram analisados pelo programa PHRED para verificar a qualidade das sequências, onde as sequências com qualidade PHRED acima de 20 foram analisadas com a ferramenta Basic Local Align Sequence Tool – (BLAST, 2014) para confirmação de gênero.

## **5.8. Influência de fatores ambientais pH, temperatura e concentração de amônia sobre crescimento bacteriano *in vitro***

### **5.8.1. Obtenção do inóculo bacteriano**

Para o preparo do inóculo bacteriano a ser semeado na análise de crescimento das bactérias sob diferentes condições ambientais, os seis isolados de *Aeromonas* spp. foram cultivados, individualmente, em meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA) em estufa bacteriológica a 28 °C por 24 horas. Os isolados cultivados

foram transferidos para tubos de vidro contendo 8 ml de solução salina 0,85 % e, em seguida agitados em vórtex.

Os isolados foram então quantificados com o auxílio de um espectrofotômetro visível 325-1000 nm V-1100-PRÓ-ANÁLISE® e ajustados quanto a sua concentração com solução salina 0,85 % para a escala 0,5 MC FARLAND que corresponde a  $2,40 \times 10^9$  bactérias/ml de solução salina. A mensuração da escala 0,5 MC FARLAND foi obtida através de leitura a 580 nm, apresentando uma O.D. (densidade óptica) de 0,167 (OLIVEIRA, 2014).

Em seguida foram realizadas diluições para determinação da concentração adequada para contagem de colônias bacterianas, isto é, aquela resultante no crescimento de 30 a 300 colônias. Para isso, foi realizada uma diluição seriada colocando-se 1 ml da solução bacteriana com a turvação adequada da escala 0,5 MC FARLAND) em 9 ml de solução salina, obtendo-se as diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ . Estas diluições foram semeadas em alíquotas de 100µl com auxílio de alça de Drigalsky sobre a superfície de placas contendo meio de cultura TSA (Método *Spread Plate*) (OLIVEIRA, 2011) e incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C durante 24 horas. Essas análises foram realizadas em triplicata.

A diluição adequada à contagem de colônias bacterianas (Unidades Formadoras de Colônias- UFC) foi adotada nos experimentos subsequentes.

### **5.8.2. Determinação da influência de diferentes condições ambientais no crescimento de *Aeromonas* spp. *in vitro***

Para verificar a influência dos fatores ambientais pH, temperatura e concentração de amônia sobre o crescimento de *Aeromonas* spp., foram escolhidos cinco pontos de variação de cada fator (incluindo o ponto ideal para crescimento bacteriano) (OLIVEIRA et al., 2008).

Foram utilizados os seis isolados de *Aeromonas* spp. obtidos segundo o item 5.6. Estes isolados foram submetidos às diferentes condições de pH, temperatura e concentrações de amônia. Foram realizados experimentos independentes para cada fator ambiental. Os seis isolados foram analisados em triplicata em cada experimento. Para os três experimentos *in vitro* de pH, temperatura e concentração de amônia os isolados foram sempre quantificados por espectrofotometria e diluídos em solução salina como descrito no item **5.8.1**.

### **5.8.2.1. Condições de cultivo *in vitro* para os diferentes pHs avaliados**

Para cultivo *in vitro* foi utilizado meio de cultura TSA estéril através de autoclavagem a 120 °C durante 15 minutos.

A modificação do pH do meio de cultura ocorreu pela adição de soluções a 1 M de ácido clorídrico e de hidróxido de sódio, sendo esta última esterilizada em autoclave por 15 minutos a 120 °C. Ambas soluções foram mantidas em geladeira até sua utilização.

As soluções foram adicionadas ao meio de cultura ainda líquido a temperatura em torno de 37 °C e, com o auxílio de um pHmetro (Microprocessado Digital de Bancada Modelo DLA-PH) foram obtidos os pontos desejados de pHs 5,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10, sendo o pH 7,0 considerado o pH controle de acordo com Cereser et al., (2013). O preparo das placas foi realizado em capela de fluxo laminar horizontal esterilizada com álcool 70% e as placas foram submetidas à luz ultravioleta durante 30 minutos antes da utilização, assim como as pipetas de paster e o condutivímetro do pHmetro.

Alíquotas de 100 µL dos isolados foram semeadas com auxílio de alça de Drigalsky sobre a superfície de placas contendo meio de cultura TSA com os pHs já alterados (Método *Spread Plate*) (OLIVEIRA, 2011). Cada isolado, em cada tratamento foi analisado em triplicata. As placas foram incubadas por 24 horas à 28 °C.

### **5.8.2.2. Condições de cultivo *in vitro* para as diferentes temperaturas avaliadas**

Para o experimento envolvendo diferentes temperaturas, os isolados foram também cultivados *in vitro* em meio de cultura TSA incubados em estufa bacteriológica por 24 horas, nas mesmas condições assépticas descritas no experimento anterior. Para se conseguir as diferentes temperaturas as placas foram incubadas em estufa bacteriológica ou em sala refrigerada com temperaturas controladas para atingir os tratamentos de 22, 25, 28, 31, 34 °C, sendo estas incubadas após a semeadura, durante 24 horas. O tratamento 28 °C constituiu o grupo controle (OLIVEIRA et al., 2014). Os isolados foram semeados com auxílio de alça de Drigalsky sobre a superfície de placas contendo meio de cultura TSA (Método *Spread Plate*) (OLIVEIRA, 2011). As análises foram realizadas em triplicatas.

### 5.8.2.3. Condições de cultivo *in vitro* para as diferentes concentrações de amônia avaliadas

Os isolados foram cultivados *in vitro* em meio de cultura TSA. O meio de cultura foi feito com uma solução tamponante de Tris HCl a 0,1 M e pH 7,8. Para adição de amônia às placas foi preparada uma solução de sulfato de amônia a 1,0 M ultrafiltrado com filtros 0,47 µm em frasco estéril. Sendo acrescentados os volumes de 5,5 µL, 16,5 µL, 33 µL, 49,5 µL e 66 µL de sulfato de amônia (1,0 M) para chegar às concentrações de 0,1, 0,3, 0,6, 0,9 e 1,2 mg/L de amônia não ionizada, respectivamente, no meio de cultura a temperatura de 37 °C. Todo o preparo das placas foi realizado em capela de fluxo laminar horizontal esterilizada com álcool 70 % e as placas foram submetidas à luz ultravioleta durante 30 minutos antes da utilização.

Os isolados foram semeados com auxílio de alça de Drigalsky sobre a superfície de placas contendo meio de cultura TSA com concentrações de amônia já alteradas (Método *Spread Plate*) (OLIVEIRA, 2011) As análises foram realizadas em triplicatas. As placas foram incubadas por 24 horas à 28 °C.

### 5.8.2.4. Análise estatística

Para verificar a diferença de crescimento dos isolados nas diferentes condições ambientais foi utilizado um modelo linear generalizado misto (FARAWAY, 2005). A exemplo da análise envolvendo diferentes concentrações de amônia, em que o delineamento utilizado é o de um experimento fatorial, com um fator fixo (pH, temperatura ou amônia) e um fator aleatório (isolado) e efeito de interação entre os fatores fixo e aleatório, como descrito a seguir.

Seja  $Y_{ijk}$  uma variável aleatória que apresenta contagem bacteriana em unidades de colônia *in vitro*, de *Aeromonas* spp., sobre influência de diferentes concentrações de amônia e diferentes isolados bacterianos. Assumidos que  $Y_{ijk} \sim$  Poisson  $\lambda_{ij}$  tal que,

$$P(Y_{ijk} = y_{ijk}) = \frac{e^{-\lambda_{ij}} \lambda_{ij}^{y_{ijk}}}{y_{ijk}!}, \quad i = 1, \dots, a, j = 1, \dots, b \text{ e } k = 1 \dots n,$$

em que  $\lambda_{ij} = \exp\{\mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij}\}$ , com  $\sum_{i=1}^a \tau_i = 0$ ,  $\beta_j \sim N(0, \sigma_\beta^2)$  e  $(\tau\beta)_{ij} \sim N(0, \sigma_{(\tau\beta)}^2)$

Temos que  $\tau_i$  representa o efeito do  $i$ -ésimo nível fator ppm (com  $\tau_1 = 0$ , isto é, o nível 1 correspondente ao nível de referência, que neste caso é 0,1 mg/L),  $\beta_j$  representa o efeito do  $j$ -ésimo isolado, e  $(\tau\beta)_{ij}$  representa o efeito de interação entre mg/L e isolados.

A mesma análise foi realizada para os experimentos envolvendo diferentes temperaturas e diferentes pHs. Para todas as análises foi considerado um nível de significância de 5%.

### **5.9. Análise da influência dos fatores ambientais pH, temperatura e concentração de amônia sobre a virulência de *Aeromonas* spp., segundo a mortalidade de tilápia do Nilo inoculada com *Aeromonas* spp.**

Para verificar a influência dos três fatores ambientais (pH, temperatura e concentração de amônia) sobre a virulência de *Aeromonas* spp. foi avaliada a mortalidade de alevinos de tilápia do Nilo após inoculação com *Aeromonas* spp.. Para isso, foram testados os mesmos cinco pontos de variação de cada fator utilizados no experimento anterior *in vitro*. Este experimento foi dividido em três etapas (experimentos) independentes, sendo uma para cada fator ambiental.

Para subsidiar cada experimento foram utilizados 120 alevinos de tilápia do Nilo, sexualmente revertidos para o sexo masculino, provenientes do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros (CIRPA) do Projeto Agrícola Bebedouro do município de Petrolina-PE. Foram selecionados alevinos com cerca de 60 dias e cerca de 8 g de peso médio. Foram distribuídos seis alevinos em cada aquário, contendo 60 L de volume útil. Cada um dos cinco tratamentos, de cada etapa individual, possuíram quatro repetições.

Os aquários de todos os experimentos possuíram aeração constante por contato, por meio de pedras microporosas ligadas através de mangueiras de silicone a mini-compressores de ar. Diariamente, os aquários foram sifonados para a retirada das fezes e restos de ração.

Antes de iniciar os experimentos, os alevinos foram adaptados por um período de quatro dias para os experimentos de pH e temperatura e, de dois dias para o experimento de amônia, sendo em seguida inoculados com *Aeromonas* spp.. A inoculação da *Aeromonas* spp. nos alevinos de tilápia do Nilo foi realizada por meio de um preparado de inóculo bacteriano com diluição em solução salina estéril a

concentração de  $10^6$  UFC/mL<sup>-1</sup>. Foi utilizado um *pool* contendo os seis isolados descritos no item 5.6. Essa solução foi injetada via intramuscular, latero-dorsal direita, em cada peixe experimental, na proporção de 0,2 ml/animal (OLIVEIRA et al., 2014).

Para a alimentação dos alevinos foi utilizada uma ração comercial (Laguna-Ocialis®). Após o desafio, os peixes foram observados a cada quatro horas durante quatro dias quanto à mortalidade. Ao final do período experimental, os peixes foram anestesiados com benzocaína diluída em água (100 mg/L) e eutanasiados por secção medular.

### **5.9.1. Obtenção das diferentes temperaturas na água dos aquários**

Foram testados os cinco diferentes pontos de temperatura citados anteriormente para os ensaios *in vitro*, onde aquários individuais, cada um contendo seis alevinos, constituíram as cinco faixas de temperatura. Os aquários apresentavam temperaturas constantes reguladas por termostatos (ROXIN®, HT-1300, 200w) exceto os de temperatura de 22 °C, que possuíam suas temperaturas mantidas com auxílio de ar-condicionado. Todos os aquários possuíam faixa sensora de temperatura fixada aos aquários para acompanhamento periódico das temperaturas. As mensurações para controle das temperaturas dos aquários foram realizadas quatro vezes ao dia durante o período de aclimação dos peixes aos aquários e seis vezes ao dia durante as 96 horas após inóculo bacteriano, ajustando-se as temperaturas sempre que necessário.

### **5.9.2. Obtenção dos diferentes pHs nos aquários**

Foram testados os cinco diferentes pontos de pHs citados anteriormente para os ensaios *in vitro*. Aquários individuais, cada um contendo seis alevinos, constituíram as cinco variações de pH descritas anteriormente. Para variação do pH da água dos aquários foi adicionada uma solução de ácido clorídrico (HCl) 3 M e de hidróxido de sódio (NaOH) 3 M para ajustar os tratamentos. O pH da água dos aquários foi monitorado a cada quatro horas durante todo o experimento com auxílio de uma sonda Waterproof Tester-Hanna Instruments® HI 98129.

### **5.9.3. Obtenção das diferentes concentrações de amônia nos aquários**

Para obtenção das diferentes concentrações de amônia foi adicionada aos aquários uma solução de sulfato de amônia com 0,300 mg/L de NAT (Nitrogênio Amôniacal Total), chegando-se às concentrações de 0,1, 0,3, 0,6, 0,9 e 1,2 mg/L com auxílio de espectrofotometria utilizando-se o método do azul de indofenol (STANDARD METHODS, 2012) construindo-se uma curva de calibração (figura 2, dos anexos). As concentrações de amônia na água foram monitoradas a cada 6 horas, e suas concentrações foram ajustadas para concentração desejada quando preciso. Ao passo que nestes intervalos as variáveis de pH e temperatura foram mantidas constantes com intuito de não alterar o equilíbrio da amônia na água, para isso utilizou-se sala refrigerada com temperatura constante, e soluções de HCl (3 M) e NaOH (3 M) para correção do pH.

Os animais passaram por um período de aclimação durante dois dias nos aquários recebendo uma ração comercial duas vezes ao dia. E, após esse período não receberam alimentação, para diminuir o incremento amoniacal oriundo das excretas dos animais segundo Kuçuk, (2014). No primeiro dia experimental os animais receberam o inóculo bacteriano de *Aeromonas spp.* e foram observados por 96 horas de 4 em 4 horas quanto a mortalidade.

#### 5.9.4. Análise estatística

Para verificar a diferença de virulência dos isolados nas diferentes condições ambientais foi utilizado um método estatístico GEE (Equações de Estimção Generalizadas – Generalized Estimating Equations) (MOLENBERGHS e VERBEKE, 2005), em que a resposta: número de peixes mortos no aquário  $i$ , é avaliada repetidas vezes ao longo do tempo, e os aquários correspondem as unidades experimentais. Para aplicação do método, em cada tempo, precisamos especificar a média da variável da resposta, que é dada por:

$$E[Y_{it}] = m_{it} \frac{\exp(\beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \beta_3 x_{i3} + \beta_4 x_{i4} + \beta_5 * tempo_t)}{1 + \exp(\beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \beta_3 x_{i3} + \beta_4 x_{i4} + \beta_5 * tempo_t)}$$

Em que  $Y_{it}$  é a variável resposta, número de peixes mortos no aquário  $i$  no tempo  $t$ ,  $m_{it}$  correspondente ao número de peixes vivos no  $i$ -ésimo aquário no tempo  $t$ ,  $x_{i1}$  é igual a 1 se o  $i$ -ésimo aquário recebe o tratamento 2 e 0 caso contrário,  $x_{i3}$  é igual a 1 se o  $i$ -ésimo aquário recebe o tratamento 4 e 0 caso contrário, e  $x_{i4}$  é igual

a 1 se o *i*-ésimo aquário recebe o tratamento 5 e zero caso contrário. Neste caso, o tratamento 1 corresponde ao nível de referência ( $\beta_0$  na equação do modelo), e os  $\beta_j$ 's,  $j = 1, \dots, 4$ , correspondem a diferenças entre o efeito do tratamento 1 e o efeito dos demais tratamentos. Levando em conta o nível de significância de 5%.

### 5.10. Análise de expressão gênica

Segundo os resultados obtidos nos itens 5.8 e 5.9 foram determinados dois pontos de cada fator ambiental para análise da expressão de genes de virulência.

Para se detectar a diferença de expressão gênica entre os tratamentos, foi empregada a técnica de RT-PCR em tempo real. As análises de expressão foram realizadas separadamente para cada um dos genes em cada condição experimental em três experimentos independentes *in vitro* utilizando-se a mesma metodologia descrita nos itens **5.8.2.1.**; **5.8.2.2.**; **5.8.2.3** para pH, temperatura e amônia, respectivamente. No entanto o meio de cultura utilizado foi o Trypticase Soy Broth (TSB).

### 5.11. Escolha dos genes a terem suas expressões quantificadas

Os três genes mais frequentes nos isolados avaliados foram submetidos a análise de expressão gênica por qPCR quando submetidos a diferentes condições ambientais. São eles: aerolisina, lipase e *fla*.

### 5.12. Delineamento dos iniciadores

Para as reações de PCR em Tempo Real foram delineados iniciadores específicos para os genes de interesse (aerolisina, lipase e *fla*) e, para os genes constitutivos (gene para o fator sigma-70 da RNA polimerase (RopD) codificante de uma subunidade essencial da RNA polimerase para o reconhecimento de sítios promotores, gene para o 16S rRNA responsável pela transcrição de uma unidade ribossomal e o gene para a DNA girase (GyrA) relacionado com a produção da enzima DNA girase que participa da síntese do DNA).

Os iniciadores foram desenhados com a utilização do programa Primer3 Plus (UNTERGASSER et al., 2007). A qualidade dos iniciadores foi verificada no site <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>>, escolhendo-se aqueles que possuíram  $\Delta G$  maior que 0, sendo este ideal para que reações espontâneas não ocorram, que não formem iniciadores auto complementares e, que não possuíssem temperaturas de *melting* com diferença superior a 1,0 °C entre si.

Os iniciadores foram delineados para amplificar um fragmento de até 300 pb. Em seguida, foi verificada a especificidade dos iniciadores desenhados, observando-se o escore e E-value no site <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>.

### 5.13. Extração de RNA

O RNA bacteriano total foi extraído com a utilização do kit Rneasy (Qiagen®) e da Dnase (Qiagen®). Após 24 horas de cultivo dos isolados, separadamente, em Tryptic Soy Base (TSB) caldo, segundo cada condição testada (pH, temperatura e concentração de amônia). Os isolados foram diluídos para a escala 1MC FARLAND, que apresenta uma quantidade de  $1,40 \times 10^{10}$  bactérias por ml de meio de cultura.

Para extração do RNA, foi utilizado 1,5 ml da cultura a 1 MC FARLAND, que foi centrifugada a 13.000 g por 3 minutos, sendo o sobrenadante descartado, então acrescentados 375 µL de água ultrapura. Em seguida foram adicionados 750 µL de RNA *Protect Bacteria Reagent*. Agitou-se em vórtex por 5 segundos e incubou-se a temperatura ambiente por 5 minutos, seguindo-se a uma centrifugação por 10 minutos a 5.000 g. Este procedimento foi necessário para proteger o RNA total e estabilizar a transcrição deste, descartando-se em seguida o sobrenadante e secando-se o microtubo em um papel toalha.

Em seguida, foram adicionados 200 µL do tampão TE (30 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0) contendo 15 mg/mL de lisozima e 3 µL de proteinase K (0,05 µg/µl) ressuspendendo-se o *pellet* pipetando-se várias vezes até desmanchá-lo. O material foi agitado em vórtex por 10 segundos e incubado a temperatura de 37 °C por 15 minutos, agitando-o em vórtex a cada três minutos por 10 segundos. Em seguida foram adicionados 700 µL de tampão RLT (contido no kit Rneasy Qiagen®), acrescido de 10 µL de b-mercaptoetanol por ml de tampão, os tubos então foram agitados em vórtex vigorosamente. Em seguida, foram acrescentados 500 µl de etanol absoluto.

Para purificação do RNA, 700 µL do lisado anterior foi transferido para uma coluna fornecida pelo fabricante do kit e prodeceu-se com a centrifugação por 15 segundos a 8.000 g, descartando-se o líquido que passou pela coluna. Em seguida foram adicionados 350 µL do tampão RW1(contido no kit Rneasy Qiagen®) à coluna, que foi centrifugada por 15 segundos a 8.000 g, descartando-se o líquido que passou pela coluna.

O material foi adicionalmente tratado com Dnase. Para isso, foram adicionados 80 µl de uma solução constituída de 10 µl de Dnase (0,08 mg/ µl) (kit Dnase Qiagen®) e 70 µl de tampão RDD (kit Dnase Qiagen®) . Procedeu-se uma centrifugação por 15 segundos a 8.000 g da coluna, incubando-se logo em seguida a temperatura ambiente por 15 minutos.

O protocolo foi seguido da adição de 350 µl do tampão RW1 (contido no kit Rneasy Qiagen®), à coluna, incubando-se por cinco minutos e centrifugando-se por 15 segundos a 8.000 g. Descartou-se o líquido que passou pela coluna. A coluna foi colocada em um novo tubo de 2 ml seguido da adição de 500 µl do tampão RPE (contido no kit Rneasy Qiagen®) , à coluna, seguindo-se a uma centrifugação por 15 segundos a 8000 g. Descartou-se o líquido que passou pela coluna. Em seguida foi adicionado 500 µl do tampão RPE (contido no kit Rneasy Qiagen®), à coluna e centrifugou-se por 2 minutos a 8.000 g, colocando-se em seguida a coluna em um novo tubo de 1,5 ml.

Para eluição do RNA foram adicionados 50 µl de água livre de Rnase à coluna, seguindo-se de centrifugação por 1 minuto a 8.000 g obtendo-se assim um primeiro lavado de RNA. Para garantir mais RNA, a coluna foi colocada em outro tubo, à qual foram adicionados 30 µl de água livre de Rnase, que foi centrifugada por 1 minuto a 8.000 g.

#### **5.14. Quantificação e análise do RNA**

Após a extração, o RNA total foi quantificado em espectrofotômetro PicoDrop®, para obtenção da concentração das amostras e do grau de pureza que foi estipulado pela análise da razão das absorbâncias 260/280 nm,

A integridade de cada amostra foi avaliada através da técnica de eletroforese em gel de agarose 1,0 %, utilizando-se um tampão de corrida TBE (90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico e 2 mM EDTA pH 8,0) elaborado com água livre de RNase (obtida com o tratamento com DEPC (Diethyl pyrocarbonate) (SIGMA®). O gel foi corado com brometo de etídeo e a corrida aconteceu a 80 V e 90 mA durante três horas. Após a corrida o gel foi observado sobre luz UV em um transluminador, sendo as imagens capturadas por um fotodocumentador para arquivamento.

#### **5.15. Síntese do cDNA**

O cDNA de cada amostra de RNA extraída foi obtido com o QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen®) segundo instruções do próprio fabricante.

Para a síntese de cDNA do experimento envolvendo diferentes pHs foram utilizados 1.300 ng de RNA total, para o experimento das diferentes temperaturas foram utilizados 1.900 ng de RNA total e para o experimento da amônia foram utilizados 2.000 ng de RNA total.

#### **5.16. Determinação da eficiência e da especificidade dos iniciadores**

A análise da eficiência de cada iniciador foi realizada segundo obtenção de uma curva padrão, por meio da diluição em série de um cDNA com a produção de um gráfico do ciclo limite (Ct) versus log<sub>10</sub> do número relativo de cópias do coeficiente de diluição.

Para confirmação da especificidade dos iniciadores foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,5 % com os produtos obtidos das qPCRs. Para isso foi utilizado um tampão TBE 1X (90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico e 2 mM EDTA pH 8,0).

#### **5.17. Escolha do gene constitutivo**

A análise para escolha do gene constitutivo foi realizada no Cotton EST Database disponível no site <<http://www.leonxie.com/referencegene.php>>.

Com esse banco de dados se analisou a variação dos Cts das amostras de cada experimento em função da utilização integrada dos programas geNorm (VADESOMPELE et al., 2002), Normfinder (ANDERSEN et al. 2004), BestKeeper (PFAFFL et al., 2004) e do método comparativo de Ct (SILVER et al., 2006), indicando qual dos genes apresentou menor variação para ser utilizado como gene constitutivo.

#### **5.18. RT-PCR em tempo real**

A RT-PCR em tempo real (genes testados como constitutivos e dos genes de virulência) foi realizada com a utilização do kit KAPA SYBR® Fast qPCR kit Master Mix (2x) Universal.

Para isso, realizou-se a amplificação do cDNA com a utilização dos iniciadores específicos para cada gene. As reações para os genes rRNA 16S e RopD foram

constituídas com um mix contendo 0,4 µM de cada iniciador, 7,5 µl de syber green master mix, 0,1 µl de rox low e 1,0 µl de cDNA, em um volume final de reação de 15 µl. Já para os genes *GyrA*, aerolisina, lipase e *fla* o mix da reação continha 0,8 µM de cada iniciador, 7,5 µl de syber green master mix, 0,1 µl de rox low e 2,0 µl de cDNA, em um volume final de reação de 15 µl. Todas as reações se iniciaram com uma fase de desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, que foi seguida de 40 ciclos compostos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. A curva de *melting* foi obtida pelo ciclo de 65 °C por 20 segundos e 95 °C por 20 segundos.

A análise dos resultados obtidos pela técnica de qPCR foi realizada pelo método de quantificação relativa descrito por Pfaffl (2002) com a utilização do programa REST 2009 v.2.0.13 (Relative Expression Software Tool).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Análise da presença de genes de virulência em isolados de *Aeromonas* spp.

No presente estudo foi possível detectar genes de virulência em isolados de *Aeromonas* spp. obtidos do Vale do São Francisco através da técnica de PCR que apresenta alta sensibilidade e especificidade podendo ser empregada para esta finalidade (MARQUES, 2011). Foi possível observar que todos os 35 isolados avaliados apresentaram ao menos um dos genes pesquisados, o que indica um grande número de isolados bacterianos com potencial patogênico obtidos de peixes da região. Os genes com maiores frequências entre os isolados foram *fla*, lipase e aerolisina como observado na Tabela 2. Observou-se que nove (25,7%) dentre os 35 isolados apresentaram três genes e, dois isolados (5,7%) apresentaram quatro genes simultaneamente.

**Tabela 2.** Relação de isolados de *Aeromonas* spp. positivos para os genes de virulência

Genes de virulência	Isolados positivos	Frequência (%)
aerolisina	12	34,3
hidrolipase	0	0,0
elastase	8	22,8
lipase	14	40,0
<i>ast</i>	4	11,4
<i>laf</i>	6	17,1
<i>fla</i>	20	57,1

O gene que codifica o flagelo polar *fla* foi o gene encontrado em maior frequência nos isolados (57,1%) diferindo dos dados obtidos por Marques (2011) em que a maioria dos isolados apresentaram em maior frequência o fator de virulência lipase. Oliveira (2011) verificou uma frequência de 82% em isolados de origem ambiental e Santos et al., (2010) observaram 86,4% de isolados de diversas origens com esse gene. Este fator de virulência está relacionado com a formação de flagelos e de biofilme, sendo esses mecanismos importantes de patogenicidade destes micro-organismos (SANTOS et al., 2010).

O outro gene pesquisado estando relacionado com a formação de flagelos e de biofilme, o gene *laf*, também foi encontrado nos isolados (17,1%). A frequência detectada no presente trabalho foi inferior a relatada por outros autores como Santos et al., (2010) e Kirov et al., (2002). Este fator, segundo os últimos autores, pode contribuir para o aumento da virulência bacteriana justamente por estar envolvido com a formação de biofilme e capacidade de deslocamento em ambientes aquáticos pela presença de flagelos.

O gene que codifica o fator de virulência aerolisina foi o segundo mais frequente nos isolados (34,3%) do presente estudo. Marques (2011) verificou que 36,8% isolados de *Aeromonas* spp. de origem clínica também possuíam esse gene. Já Guerra et al., (2007) observaram uma prevalência de 74,1% do fator aerolisina em isolados de *Aeromonas* spp. provenientes de amostras clínicas. O mesmo autor cita, que em humanos, a presença deste fator de virulência nos isolados está relacionado a pacientes com quadros de diarreia. Já nos peixes a enterotoxina

provoca danos às células epiteliais ocasionando principalmente quadros de edema, hemorragia de mucosas, enterite e ascite (JANDA; ABBOTT, 2010).

O gene que codifica o fator de virulência lipase foi o terceiro mais frequente (40%) no presente estudo. Esse gene possui relatos de altas frequências em outros estudos (GUERRA et al., 2007; OLIVEIRA, 2011). Ainda não foi demonstrado o mecanismo de atuação deste fator sobre a patogenicidade deste patógeno, porém sabe-se que o mesmo está relacionado a alterações nas membranas biológicas das células hospedeiras (CHUANG et al., 1997).

Para o gene codificante do fator de virulência elastase, um dos mais importantes para virulência em isolados de *Aeromonas hydrophila* (CASCÓN et al., 2000), pois está relacionado com a diminuição da resposta imunológica do hospedeiro, através da sua capacidade elastolítica, no presente estudo os isolados estudados apresentaram um percentual três vezes menor do que relatado nos trabalhos de Guerra et al., (2007) e Oliveira (2011).

O gene para o fator de virulência *ast* foi encontrado com uma frequência de 11,4% dentre os isolados, sendo três vezes menor do que o encontrado por Oliveira (2011) em *Aeromonas hydrophila* e duas vezes menor do que o citado por Sen e Rodgers (2004) em isolados de *Aeromonas* spp.. Este fator de virulência combinado a outros fatores como o *alt* está principalmente correlacionado a produção de enterotoxinas com caráter citotônico contribuindo para a formação do edema intersticial (SHA; KOZLOVA; CHOPRA, 2002).

O gene que codifica o fator de virulência hidrolipase foi o único não detectado entre todos os isolados avaliados. Sen (2005) encontrou a presença deste fator em quatro isolados de *Aeromonas hydrophila* e em dois isolados de *Aeromonas bestiarum* em um total de 25 isolados, o que indica a baixa prevalência desse gene.

A predominância de um determinado gene em uma dada população está correlacionada com o ambiente em que o isolado se encontra, dependendo muito da pressão de seleção a que está exposto (PALUMBO et al., 1989; MARQUES, 2011).

Foi observado que 25,7% dos 35 isolados avaliados apresentaram no mínimo três fatores de virulência, nove vezes mais do que a frequência encontrada por Marques (2011) para amostras de *Aeromonas* spp. de origem clínica. A combinação de fatores de virulência está relacionada com o maior potencial patogênico da bactéria (SHA et al., (2002); SEN; RODGERS (2004); GUERRA et al., 2007) uma vez que a virulência deste patógeno é considerada multifatorial (KHAJANCHI et al.,

2010). Isto pode ser observado Segundo Heuzenroeder et al., (1999) em modelos animais.

A partir dos resultados observados nessa análise foram escolhidos seis isolados de *Aeromonas* spp. que apresentavam uma combinação de três dos genes de virulência mais frequentes pesquisados (Tabela 3). Todos os isolados possuíam no mínimo dois genes de virulência, considerados por isso com maior potencial de virulência. Esses isolados foram utilizados em todas as análises posteriores.

**Tabela 3.** Isolados de *Aeromonas* spp. escolhidos com base na presença dos três genes de virulência mais frequentes.

Identificação do isolado	Genes de virulência		
	Aerolisina	lipase	<i>fla</i>
G38	+	+	+
A3	+	+	-
67	-	+	+
10	-	+	-
72b	+	+	-
G15	+	-	+

## 6.2. Sequenciamento

Após análise dos eletroferogramas (Figura 3, dos anexos) dos seis isolados descritos na Tabela 3 gerados pelos sequenciamentos dos fragmentos amplificados por PCR com a utilização de iniciadores universais para procaríoto, foi possível observar que todos os isolados apresentaram homologia com o gênero *Aeromonas* spp.. Não foi possível identificar espécies com a utilização desse iniciador. Diferindo dos resultados de Ghatak et al., (2007) que conseguiram identificar espécies de importância clínica de *Aeromonas* por análise desse gene.

## 6.3. Crescimento de *Aeromonas* spp. submetidas a diferentes pHs, temperaturas e concentrações de amônia

Para a determinação da diluição adequada para contagem de colônias bacterianas foram realizadas diluições seriadas de inóculos de *Aeromonas* spp.

Os valores de UFC mais apropriados (encontrados no intervalo entre 30 e 300 UFC/ml<sup>-1</sup>) (OLIVEIRA, 2011) foram detectados para a diluição 10<sup>-6</sup>, que apresentou em média 136 UFCs/ml<sup>-1</sup> (Figura 4 contida nos anexos). Sendo assim, a diluição do inóculo adotada para os experimentos mencionados nos itens 5.8.2.1, 5.8.2.2, e 5.8.2.3 foi a de 10<sup>-6</sup>.

Os seis isolados contendo no mínimo dois dos genes de virulência mais frequentes (*fla*, lipase, aerolisina) foram submetidos a diferentes condições ambientais de pH, temperatura e concentração de amônia para verificar se esses fatores ambientais interferiam no crescimento de *Aeromonas* spp.. Uma vez que resultados da literatura têm demonstrado que isolados de *Aeromonas* podem apresentar diferentes níveis de atividade patogênica correlacionados a fatores de virulência a depender de condições ambientais (OLIVIER et al., 1981; COSTA, 2003).

Assim, com o objetivo de se identificar pontos de pH, temperatura e concentração de amônia que influenciem o crescimento de *Aeromonas* spp., isto é, com crescimento bacteriano diferente do ponto tido como ideal para *Aeromonas* spp. foi realizada uma análise baseada em um modelo linear generalizado misto.

Para a variável pH verificou-se que o crescimento bacteriano no pH 10,0 diferiu significativamente em relação ao grupo controle (pH 7,0) como demonstrado na Tabela 4, de modo que o pH 10,0 restringiu o crescimento da bactéria em relação ao grupo controle (Figura 5, imagens E e B, contida nos anexos).

**Tabela 4.** Resultados da análise que utilizou um modelo linear generalizado misto para verificar a influência do pH sobre o crescimento de *Aeromonas* spp. *in vitro*.

Tratamentos	Estimativa	Desvio Padrão	Valor Z	Pr (> z )
pH 7,0 (Controle)	6,0037	0,5502	10,912	< 2 <sup>e-16</sup> ***
pH 5,0	-1,2247	0,6625	-1,849	0,0645
pH 8,0	-0,5042	0,6552	-0,770	0,4416
pH 9,0	-1,2203	0,6553	-1,862	0,0626
pH 10,0	-3,5023	0,6634	-5,280	1,29 <sup>e-07</sup> ***

Significado dos símbolos: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1

As *Aeromonas* são organismos ubíquos, sendo encontrados em diversos ambientes como alimentos, rede de esgoto e águas salina, salobra e doce, entre outras fontes. Estes ambientes, principalmente o aquático, possui diferentes combinações de fatores ambientais (OLIVEIRA, 2011) e, já foi observado pela literatura que essas bactérias podem crescer em uma ampla faixa de pH variando de 4,8 a 10,0 (COSTA, 2003; LAMBERT; BIDLAS, 2007; JANDA; ABBOTT, 2010). Rael e Frankenberger (1996) demonstraram uma redução significativa na taxa de crescimento de *Aeromonas veroni* quando submetidas a uma maior alcalinidade quando comparada ao pH 7,94, o que corrobora as informações obtidas neste trabalho, onde para o pH 10,0 houve menor crescimento de bactérias quando comparado ao grupo controle.

Os demais tratamentos para pH (5,0, 8,0 e 9,0) não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle (pH 7,0) (Tabela 4), fato que corrobora com os dados de Sautour et al. (2003) que sugerem valores não significativos de diferença de crescimento de *Aeromonas hydrophila* sob pHs na faixa de 5,0 a 9,0. Estes micro-organismos desenvolvem-se melhor em pH 7,0 ou levemente alcalino (CERESER et al., 2013) o que também pode ser observado pelos resultados do presente experimento.

Em relação a temperatura, foi possível verificar que todas as temperaturas apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle 28 °C (Tabela 5). De forma que em todos os tratamentos houve uma redução do crescimento bacteriano quando comparado ao grupo controle (A temperatura 31 °C apresentou o maior nível de significância sobre o crescimento *in vitro* dos isolados de *Aeromonas* spp. quando comparada ao grupo controle (Figura 6, contida nos anexos)).

**Tabela 5.** Resultados da análise que utilizou um modelo linear generalizado misto para verificar a influência da temperatura sobre o crescimento de *Aeromonas* spp. *in vitro*.

Tratamentos	Estimativa	Desvio Padrão	Valor Z	Pr (> z )
28 °C (Controle)	5,9067	0,4398	13,430	< 2 <sup>e-16</sup> ***
22 °C	-1,5484	0,5599	-2,765	0,00568 **
25 °C	-1,4633	0,5599	-2,614	0,00896 **
31 °C	-2,7346	0,5629	-4,858	1,18 <sup>e-06</sup> ***
34 °C	-1,6922	0,5613	-3,015	0,00257 **

Significado dos símbolos: 0 ‘\*\*\*\*’ 0,001 ‘\*\*\*’ 0,01 ‘\*\*’ 0,05 ‘.’ 0,1

As *Aeromonas* spp. são organismos que podem ser encontrados em diversos ambientes podendo crescer entre temperaturas de 22 a 37 °C (JANDA; ABBOTT, 2010), faixa essa que abrange todos os pontos analisados neste trabalho e, Kirov (1993) cita que este patógeno pode multiplicar-se inclusive à temperatura de 4 °C. No entanto, no presente estudo foi verificada a influência de diversos pontos de temperatura sobre o crescimento de *Aeromonas* spp., sendo a temperatura de 31 °C a mais significativa. Fato esse que indica que a temperatura pode não inibir o crescimento dos isolados mas alterar a taxa de crescimento dos mesmos.

O fato do número de UFCs ter diminuído nos tratamentos com diferentes temperaturas em relação ao grupo controle não significa dizer que houve redução do potencial de virulência, isso foi comprovado por Kirov (1993) que verificou que as *Aeromonas* são capazes de se multiplicar em alimentos provocando casos de toxinfecção alimentar no homem, levando a quadros de diarreia, que pode estar relacionada a produção de enterotoxinas como a aerolisina (GUERRA et al., 2007).

Para a variável concentração de amônia pode-se observar que a concentração de 0,9 mg/L foi significativa em relação ao grupo controle (Tabela 6), tendo promovido maior crescimento bacteriano (Figura 7 contida nos anexos, placa de petri A e D). As *Aeromonas* são micro-organismos pertencentes à família *Aeromonadaceae*, capazes de utilizar amônia como fator de crescimento (COLWELL; MACDONELL; LEY, 1986). O aumento da concentração de amônia em ambientes aquáticos, gerado pela degradação da matéria orgânica, está relacionado à maior proliferação de micro-organismos patogênicos nestes ambientes e a maior probabilidade de contração de doenças por organismos aquáticos (LANGER; VARGAS, 2004).

**Tabela 6.** Análise utilizando um modelo linear generalizado misto para verificar a influência da concentração de amônia sobre o crescimento de *Aeromonas* spp. *in vitro*.

Tratamentos	Estimativa	Desvio Padrão	Valor Z	Pr (> z )
0,1mg/L Controle	5,10739	0,39040	13,083	<2e-16 ***
0,3 mg/L	0,32348	0,25381	1,274	0,2025
0,6 mg/L	0,03727	0,25390	0,147	0,8833
0,9 mg/L	0,54143	0,25349	2,136	0,0327 *
1,2 mg/L	-0,27614	0,25446	-1,085	0,2778

Significado dos símbolos: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1

É importante ressaltar que concentrações acima de 0,1 mg/L podem ser tóxicas para peixes, causando estresse aos mesmos. Assim, um maior crescimento bacteriano em altas concentrações de amônia, aliado ao imunocomprometimento dos peixes podem levar ao favorecimento da instalação de bactérias oportunistas como *Aeromonas* spp. (LANGER; VARGAS, 2004; KUBTIZZA, 2005).

E, em sistemas modernos de criação de peixes costuma-se utilizar sistemas intensivos de criação que são caracterizados por grande densidade de animais e elevados níveis de arraçoamento, levando a um acúmulo material orgânico e, por consequência ao aumento dos teores de amônia na água, que associado a outros fatores elevam o estresse dos animais propiciando a ocorrência de doenças (ROTTA, 2003).

Os resultados dos três experimentos *in vitro* demonstraram que as diferentes variáveis ambientais de pH, temperatura e concentração de amônia exercem influência sobre o crescimento bacteriano *in vitro*. Para se testar a influência dos mesmos fatores ambientais sobre a virulência/patogenicidade de *Aeromonas* spp. quando instaladas em peixes, esses patógenos foram inoculados em tilápias do Nilo submetidas às mesmas faixas de variação dos experimentos *in vitro*.

#### **6.4. Mortalidade de peixes inoculados com *Aeromonas* spp. e submetidos a diferentes pHs, temperaturas e concentrações de amônia**

Visando verificar a influência de variações nos três fatores ambientais avaliados (pH, temperatura e concentração de amônia) sobre a virulência de *Aeromonas* spp. foi avaliada a mortalidade de alevinos de tilápia do Nilo inoculados com *Aeromonas* spp. em função do tempo de morte dos alevinos.

Em relação a variável pH pode-se observar diferença significativa nos pontos de pHs 8,0 e 10,0 em relação ao grupo controle (pH 7,0) (Tabela 7). Sendo que no pH 8,0 houve diminuição da mortalidade em relação ao pH 7,0 e no pH 10,0 houve um aumento na mortalidade dos indivíduos em relação ao pH 7,0. Nos demais tratamentos não houve diferença com relação ao grupo controle.

**Tabela 7.** Resultados da análise que utilizou um modelo de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) para verificar a influência de diferentes pontos de pH sobre a mortalidade de Tilápias do Nilo inoculadas com *Aeromonas* spp.

Tratamentos	Estimativa	Desvio Padrão	Valor Z	Pr (> z )
pH 7,0 (controle)	-1,66507627	0,22467333	-7,41109884	1,252572 <sup>e-13</sup> ***
pH 5,0	-0,03352784	0,37518716	-0,08936297	9,287935 <sup>e-01</sup>
pH 8,0	-0,67141427	0,30958339	-2,16876712	3,010037 <sup>e-02</sup> *
pH 9,0	0,15654494	0,21715802	0,72088031	4,709832 <sup>e-01</sup>
pH 10,0	0,45920254	0,20954370	2,19144042	2,841994 <sup>e-02</sup> *
tempo	0,18590823	0,02071718	8,97362407	2,869153 <sup>e-19</sup> ***

Significado dos símbolos: 0 ‘\*\*\*’ 0,001 ‘\*\*’ 0,01 ‘\*’ 0,05 ‘.’ 0,1

Apesar dos resultados do experimento *in vitro* demonstrarem que o pH 8,0 não influenciou o crescimento de *Aeromonas* spp., isto é, elas cresceram da mesma forma que no pH ótimo (Tabela 4), o pH 8,0 diminuiu a mortalidade de peixes infectados com *Aeromonas* spp. (Tabela 7). Vale ressaltar que uma coisa é a condição de crescimento bacteriano *in vitro*, outra coisa é a condição ótima de estabelecimento e virulência do micro-organismo *in vivo*, onde o patógeno pode estar sofrendo interação com ambiente e hospedeiro. O pH 8,0 é próximo do ideal para criação de peixes (KUBITZA, 1998), por esse motivo esse ponto de pH pode não ter causado estresse no animal a ponto de debilitá-lo para que o patógeno se disseminasse, fato que sugere que o processo de doença está mais relacionado com o imunocomprometimento do animal do que com as condições ideais de crescimento bacteriano.

O pH 10,0 influenciou negativamente o crescimento dessas bactérias *in vitro* (Tabela 4). Apesar disso, esse pH demonstrou alterar a taxa de mortalidade dos peixes inoculados com esse patógeno (Tabela 7), fato que reforça mais ainda o caráter oportunista dessa bactéria. As tilápias são peixes que conseguem tolerar uma ampla variedade de ambientes aquáticos como efluentes domésticos tratados em lagoas de estabilização com variações de pH entre 10,1 e 5,6 (PEREIRA; LAPOLLI, 2009), estando o pH 10,0 no limítrofe tolerado pela espécie. O pH 10,0 pode ter causado estresse nos peixes, deixando o peixe imunocomprometido e, a *Aeromonas* ter se aproveitado dessa situação para causar o processo doença culminando com a morte do animal. Esse fato reforça a teoria que fatores abióticos

podem influenciar a taxa de replicação bacteriana, mas não significa que a virulência do patógeno será diminuída (GUERRA et al., 2007).

Segundo Baldisseroto (2009) a piscicultura pode ser bem desenvolvida em pHs de 6,0 a 9,0, sendo que Boyd (1990) e Hein e Brianese (2004) mencionam que o pH ideal para piscicultura é de 7,0 a 8,5 onde deve-se haver um controle e constância de outras variáveis do ambiente como temperatura e concentração de oxigênio. Assim, a criação de peixes nessa faixa de pH não favoreceria o aparecimento de doenças.

Para a variável temperatura pode-se observar na Tabela 8 que não houve diferença significativa da mortalidade dos peixes inoculados com *Aeromonas* spp. em função do tempo entre os tratamentos em relação ao grupo controle (28 °C). Já nos experimentos *in vitro*, todas as temperaturas alteraram o número de colônias observadas (Tabela 5). Fato esse que indica que a temperatura influencia a taxa de replicação bacteriana mas não dispara o processo doença no hospedeiro.

**Tabela 8.** Resultados da análise que utilizou um modelo de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) para verificar a influência de diferentes pontos de temperatura sobre a mortalidade de Tilápias do Nilo inoculadas com *Aeromonas* spp.

Tratamentos	Estimativa	Desvio Padrão	Valor Z	Pr (> z )
28 °C (controle)	-5,23648022	0,66766870	-7,84293199	4,401464 <sup>e-15</sup> ***
22 °C	0,92983853	0,78450850	1,18524978	2,359187 <sup>e-01</sup>
25 °C	0,56219718	0,68242488	0,82382281	4,100402 <sup>e-01</sup>
31 °C	0,81801986	0,62790420	1,30277813	1,926505 <sup>e-01</sup>
34 °C	-0,04573369	0,86331950	-0,05297423	9,577524 <sup>e-01</sup>
Tempo	0,13733387	0,01869834	7,34470756	2,062095 <sup>e-13</sup> ***

Significado dos símbolos: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 De acordo com Rodrigues (2007) as tilápias são peixes capazes de tolerar diversas temperaturas desde 14 a 37 °C (HUANG; LAI; WENG, 1998) e, de acordo com El-Sayed (2006) as tilápias desenvolvem-se em temperaturas de 20 a 30 °C de acordo com a espécie, não sendo esse um fator de estresse que pode levar a instalação de um patógeno oportunista.

Temperaturas entre 15 e 20 °C fazem os animais diminuírem a alimentação e nestas condições há predisposição ao aparecimento de doenças oportunistas (EL-SHERIF; AMAL; EL-FEKY, 2009), sendo que os animais entram em óbito quando

atingem 13 °C (CHARO-KARISA et al., 2004). Esse fato pode justificar a ausência de diferenças significativas de mortalidade em todos os tratamentos deste experimento, pois as temperaturas não atingiram esta faixa. As temperaturas testadas estavam na faixa de tolerância para esta espécie que vai de 20 a 37 °C como citado no parágrafo anterior. Talvez, para o surgimento de maiores taxas de mortalidade e melhor atuação do inóculo de *Aeromonas* spp., estudos posteriores pudessem ser realizados com temperaturas inferiores, que pudessem ocasionar um maior estresse aos animais, induzindo o processo doença mais facilmente.

(Quanto a concentração de amônia, foi possível observar mortalidade em todos os níveis de tratamentos). Entretanto somente foi detectada diferença significativa de mortalidade no tratamento 0,3 mg/L, sendo que nessa concentração houve maior sobrevivência de animais inoculados com *Aeromonas* spp. quando comparada ao grupo controle (0,1 mg/L) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Resultados da análise que utilizou um modelo de Equações de Estimação Generalizadas (GEE) para verificar a influência de diferentes pontos de concentração de amônia (mg/L) sobre a mortalidade de Tilápias do Nilo inoculadas com *Aeromonas* spp.

Tratamentos	Estimativa	Desvio Padrão	Valor Z	Pr (> z )
0,1 (controle)	-4,36040	0,49601	-8,79089	1,484e-18 ***
0,3	-43,22843	0,60315	-71,67109	0,000e+00 ***
0,6	0,02268	0,38578	0,05879	9,531e-01
0,9	0,15154	0,64693	0,23424	8,148e-01
1,2	-0,09468	0,59982	-0,15784	8,746e-01
tempo	0,13530	0,02573	5,25918	1,447e-07 ***

Significado dos símbolos: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*\*' 0,05 '.' 0,1

O fato do tratamento 0,3 mg/L apresentar menor mortalidade quando comparado ao controle 0,1 mg/L pode ser justificado pelo fato de que esta concentração está dentro do limite aceitável segundo Langer e Vargas (2004) que é no máximo de 0,6 mg/L para peixes. Esta tolerância pode ser observada no experimento de El-Shebly e Gab (2011) com tilápia do Nilo, onde após um período de exposição de 60 dias à concentração de 0,6 mg/L, 57,7% dos animais sobreviveram. Já Gazolla, (2003) realizou um experimento para detectar a dose letal de amônia para alevinos de Dourado (*Salminus brasilienses*) e verificou que a dose de até 0,94 mg/L não afetou a mortalidade.

Entretanto, alguns trabalhos mencionam que concentrações acima de 0,1 mg/L de amônia podem ser capazes de induzir estresse em peixes (EL-SHAFI et al, 2004; OLIVEIRA et al., 2008). De acordo com Randall e Tsui, (2002) a amônia representa um problema de toxicidade para animais em ambientes aquáticos, sendo que o sistema nervoso é o principal sistema afetado, o que leva a uma condição de estresse aos animais.

Existem diferenças entre espécies de peixes quanto aos mecanismos de tolerância à toxicidade da amônia dentre eles pode-se mencionar a produção de glutamina a partir da amônia, redução da proteólise e ativação das vias de glicogênese e gliconeogênese (RANDALL; TSIU, 2002).

Os resultados do experimento *in vitro* com amônia, do presente estudo, demonstraram que na concentração de 0,9 mg/L houve maior crescimento bacteriano se comparado ao grupo controle (Tabela 6). No entanto, nessa concentração não houve diferença de mortalidade dos peixes em relação ao grupo controle. Esse fato reforça novamente a proposição de que o processo doença é muito mais dependente do estado de debilidade do peixe do que de condições ambientais favoráveis ao crescimento bacteriano.

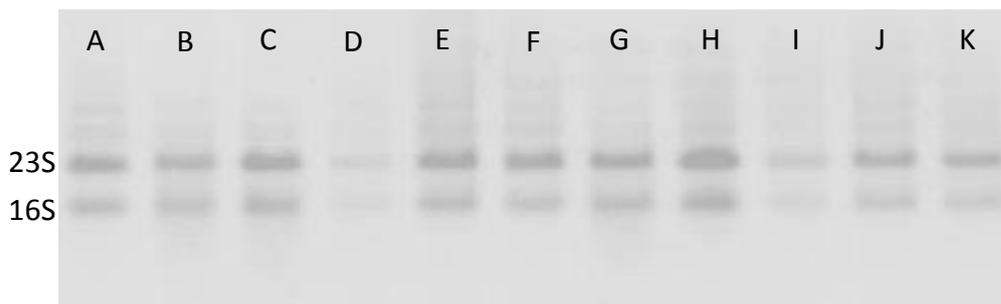
### **6.5. Análise de expressão de genes de virulência em isolados de *Aeromonas* spp. submetidos a diferentes condições ambientais**

Para verificar se os fatores ambientais pH, temperatura e amônia influenciam a expressão de genes de virulência em isolados de *Aeromonas* spp., foram realizadas análises de quantificação do mRNA dos três genes mais frequentes (*fla*, aerolisina e lipase) em isolados submetidos a dois pontos que apresentaram diferença significativa de crescimento bacteriano nos resultados do experimento relatado no item 6.3. Sendo uma combinação de seis isolados contendo no mínimo dois dos três genes de virulência a terem sua expressão avaliada foram cultivados em meios contendo as diferenças ambientais a serem testadas (pHs 7 e 10; temperaturas de 28 e 31 °C; concentração de amônia de 0,1 e 0,9 mg/L) em três experimentos independentes, sendo um para cada fator ambiental, como descrito no item 5.10.

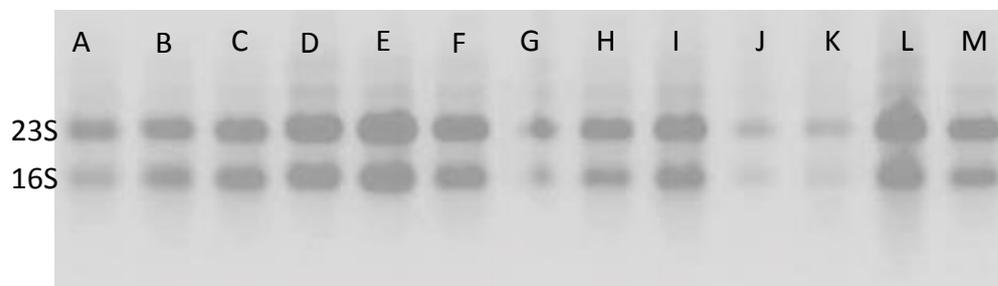
#### **6.5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA**

Para a extração de RNA dos isolados de cada tratamento, foram realizados testes com diferentes concentrações de bactéria e de quantidade de proteinase K. Inicialmente, as reações para extração do RNA foram realizadas como consta no protocolo original do kit da QUIAGEN®. No entanto, não foi obtido RNA. Assim, a concentração da bactéria utilizada foi aumentada de 0,5 para 1,0 na escala de MC FARLAND, o volume de bactéria utilizado foi aumentado de 375  $\mu$ l para 1,5 ml e a quantidade de proteinase k foi diminuída de 10 para 3  $\mu$ l (0,05  $\mu$ g/ $\mu$ l). Com essa modificação foi obtido RNA de qualidade adequada para ser empregado em análises de expressão gênica.

A integridade do RNA foi comprovada por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, onde foi possível a visualização de bandas correspondentes as subunidades de RNAs ribossomais 23S e 16S (Figuras 8, 9 e 10).

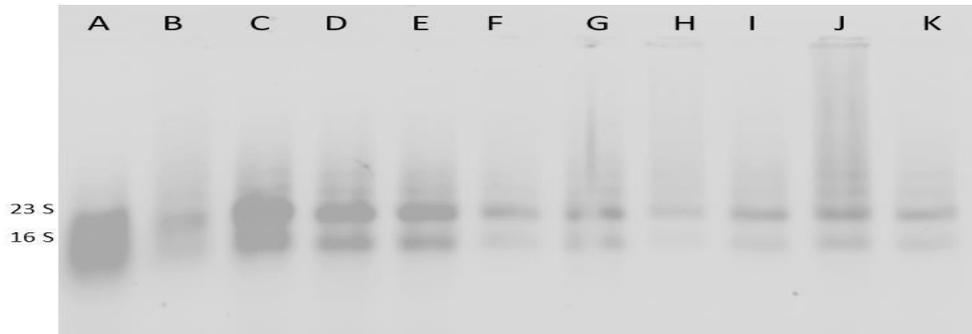


**Figura 8.** Gel de agarose a 1,0% das amostras de RNA referentes ao experimento de pH, evidenciando a integridade das duas subunidades ribossomais do rRNA 23S e 16S. As colunas na imagem referem-se aos isolados bacterianos testados. Sendo A: G38-ph7,0; B: G15-pH7,0; C: 67-pH-7,0; D:72b-pH7,0; E: A3-pH7,0; F: 10-pH7,0; G:67-pH10,0; H: 10-pH10,0; I: G38-pH10,0; J: G15-pH10,0; K: A3-pH10,0. (Fonte: Arquivo pessoal, 2015)



**Figura 9.** Gel de agarose a 1,0% das amostras de RNA referentes ao experimento de temperatura, evidenciando a integridade das duas subunidades ribossomais do rRNA 23S e 16S. As colunas na imagem referem-se aos isolados bacterianos testados. Sendo: A: G38-T28; B : A3-T28; C: 67-T28; D: 10-T28; E: 72b-T28; F: G15-

T28; G: 67-T31; H:72b-T31; I: 10-T31; J: A3-T31; K: G38-T31; L: G15-T31; M: 72b-pH10,0 (Fonte: Arquivo pessoal, 2015)



**FIGURA 10.** Gel de agarose a 1,0% das amostras de RNA do experimento de diferentes concentrações de amônia, evidenciando a integridade das duas subunidades ribossomais do rRNA 23S e 16S. As colunas na imagem referem-se aos isolados bacterianos testados com o tratamento aplicado. A: 67-0,1; B: G38-0,1; C: G15-0,1; D: A3-0,1; E: 10-0,1; F: 72b-0,1; G: 67-0,9; H: G38-0,9; I: G15-0,9; J: A3-0,9; K: 10-0,9. As imagens das colunas A e C, extravasaram durante a aplicação da amostra(Fonte: Arquivo pessoal, 2015)

A verificação da pureza do RNA extraído foi realizada por análise em espectrofotômetro. As médias das razões das leituras 260/280 nm para os experimentos de pH, temperatura e concentração de amônia foram de  $2,24 \pm 0,66$ ,  $2,13 \pm 0,07$  e  $2,18 \pm 0,30$ , respectivamente, e as médias das concentrações de RNAs obtidas foram de  $423,7 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 285,4$ ,  $535,6 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 83,45$  e  $568,2 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 139,4$ , respectivamente. A obtenção de RNA de boa qualidade é um passo crítico para realização e reprodutibilidade da técnica de RT-qPCR (BUSTIN; NOLAN, 2004; BUSTIN et al., 2009). O RNA de boa qualidade deve apresentar uma razão das absorvâncias 260/280 nm igual ou superior a 1,8 (SAMBROOK et al., 2001), o que indica ausência ou baixa contaminação por proteínas. O presente estudo apresentou razão de absorvâncias adequada, permitindo assim a utilização experimentos de PCR em tempo real.

A obtenção da concentração do RNA em  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , através da leitura em espectrofotômetro, é uma medida muito importante também, uma vez que é necessária a utilização da mesma quantidade de RNA total, de todas as amostras de um dado tratamento, no momento de síntese de cDNA. Isso irá garantir que as diferenças obtidas de expressão gênica sejam devidas a diferentes concentrações de mRNA e não por qualquer uma outra etapa anterior a qPCR (BUSTIN; NOLAN

2004). No presente estudo foi utilizada a mesma concentração de RNA total para todas as amostras de um dado tratamento.

### 6.5.2. Iniciadores para a qPCR

Foram desenhados iniciadores para os genes constitutivos (RopD, 16S rRNA e GyrA) e, para os genes a terem sua expressão quantificada (*fla*, lipase e aerolisina). Eles estão apresentados na Tabela 10. Todos os iniciadores foram delineados para amplificar um fragmento menor que 250 pb.

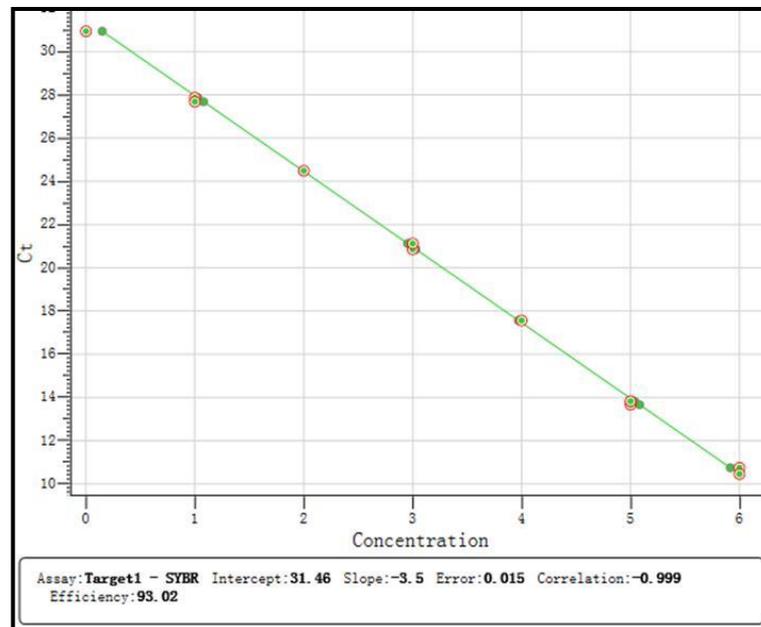
**Tabela 10.** Iniciadores delineados para realização da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

Iniciador	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado em pares de bases	Gene
RopD-F	ACCCGGAAGCGATTACCTAT	204	RopD
RopD-R	CATCACCGTCTTCGTCTTCA		
16S rRNA- F	GGCCTTGACATGTCTGGAAT	230	16S rRNA
16S rRNA- R	CGTAAGGGCCATGATGACTT		
GyrA - F	GTGCCGTGTATGACACCATC	214	GyrA
GyrA - R	ATCTCGGTGCCGTCATAGTT		
Flagellin, <i>flaA</i> - F	TTTCCAAGTTGGTGCTGATG	166	<i>Fla</i>
Flagellin, <i>flaA</i> - R	AGTCGTTGTTGTTGCTGTCG		
Lipase- F	CTACCCCGTCAGCTCATCAT	231	Lipase
Lipase- R	TCTCCGTGGAGAATTCAGG		
Aerolisina- F	ATGAGTTCAAGGCCGATGTC	203	Aerolisina
Aerolisina- R	CCAGTCCCACCACTTCACTT		

A eficiência dos iniciadores foi calculada pela obtenção de uma curva padrão elaborada através da diluição de amostras de cDNA. O coeficiente angular da reta (*slope*), correlação (*correlation*) e eficiência dos iniciadores, de cada gene analisado, podem ser visualizados nas Figuras 11, 12, 13, 14, 15. Todos os genes apresentaram correlação maior que 99% e eficiência dos iniciadores de 100%. Não foi possível construir a curva padrão para análise do gene da lipase, pois o mesmo

foi pouco transcrito nos isolados, não permitindo a obtenção da diluição necessária para a construção da curva padrão.

O cálculo de eficiência de amplificação dos iniciadores torna-se muito importante para a reprodutibilidade dos dados obtidos. Outro fator importante é que espera-se que a cada ciclo de PCR seja obtido o dobro de moléculas em relação ao ciclo anterior e, se o iniciador não possuir uma eficiência de amplificação de 100%, os valores de Ct deverão ser corrigidos na análise dos dados de um experimento de qPCR. Sendo que, os valores de eficiência próximos a 100% indicam inferências mais confiáveis na análise dos dados (PFAFFL, 2001).



**Figura 11.** Curva de eficiência dos iniciadores para o gene 16S rRNA.

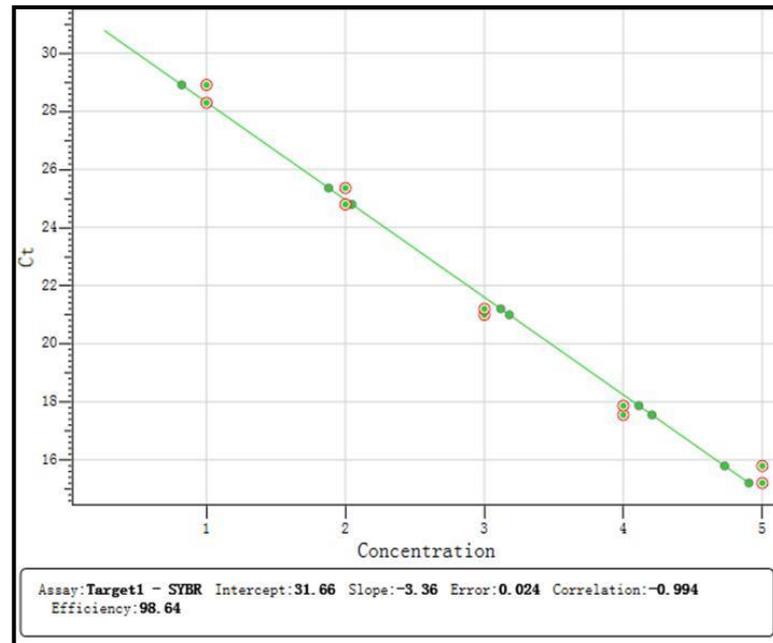


Figura 12. Curva de eficiência dos iniciadores para o gene RopD.

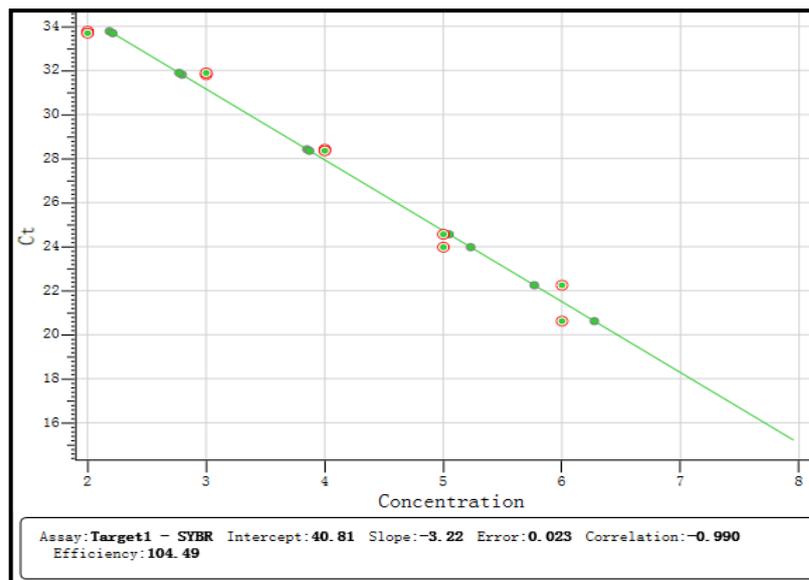
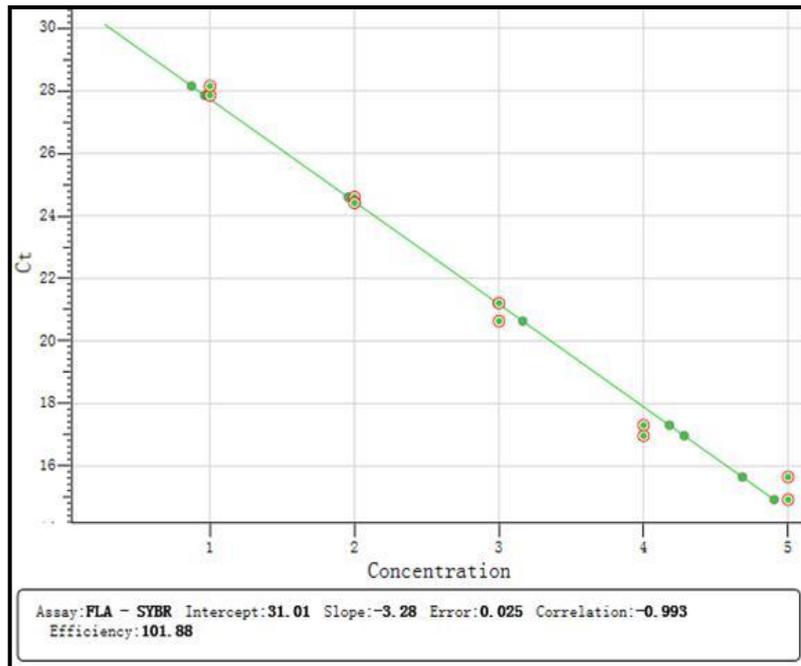
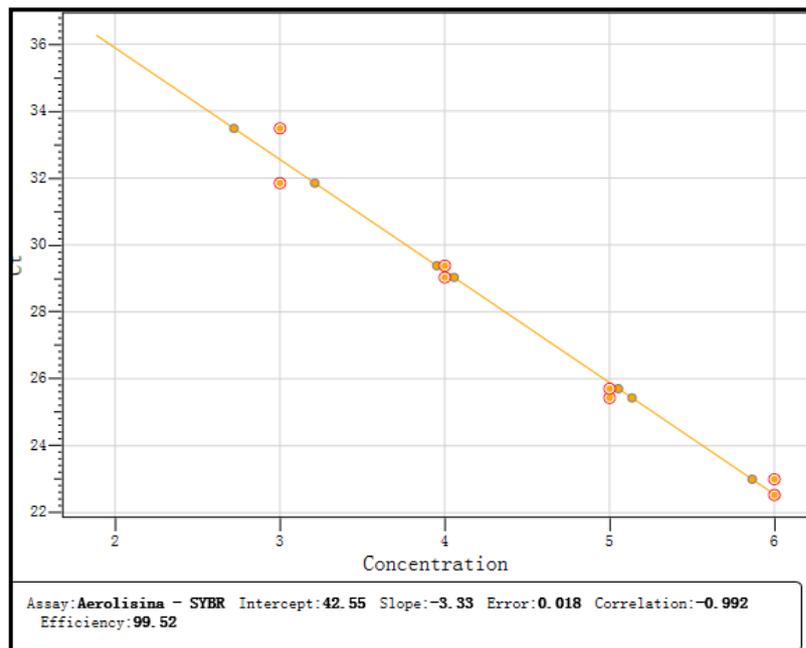


Figura 13. Curva de eficiência dos iniciadores para o gene GyrA.



**Figura 14.** Curva de eficiência dos iniciadores para o gene *fla*.

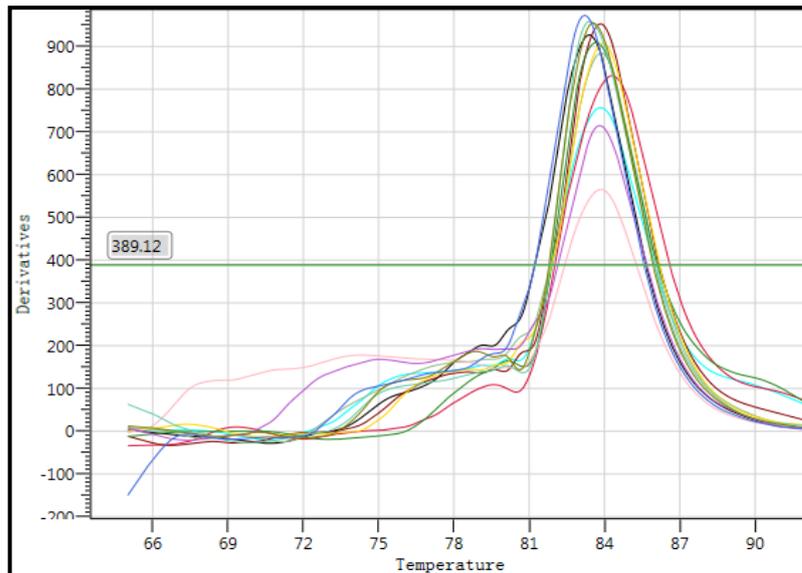


**Figura 15.** Curva de eficiência dos iniciadores para o gene Aerolisina.

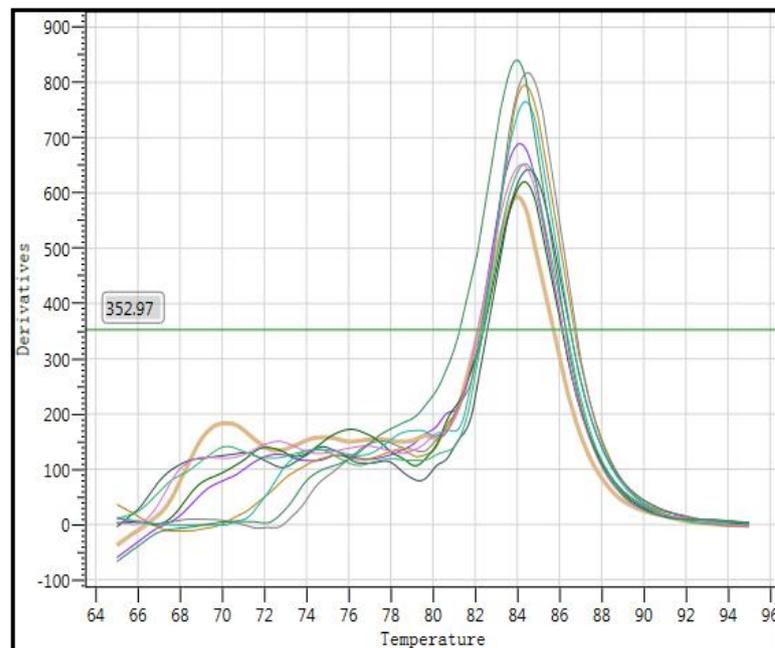
### 6.5.3. Especificidade das reações de qPCR

A curva de *melting* dos iniciadores para os genes 16S rRNA, RopD, GyrA, *fla* e aerolisina estão representadas nas figuras 16, 17, 18, 19, 20, respectivamente. No presente estudo foi possível verificar apenas um pico para cada gene estudado,

demonstrando a especificidade da reação. A curva de *melting* representa o ponto em que 50% dos produtos amplificados estão na forma de fita simples e 50% na forma de fita dupla. Esta análise permite a diferenciação de produtos específicos (visualização de um único pico) de produtos inesperados, onde se visualizariam vários picos (RANDEGGER; HACHLER, 2001).



**Figura 16.** Curva de *melting* para o gene 16S rRNA.



**Figura 17.** Curva de *melting* para o gene RopD.

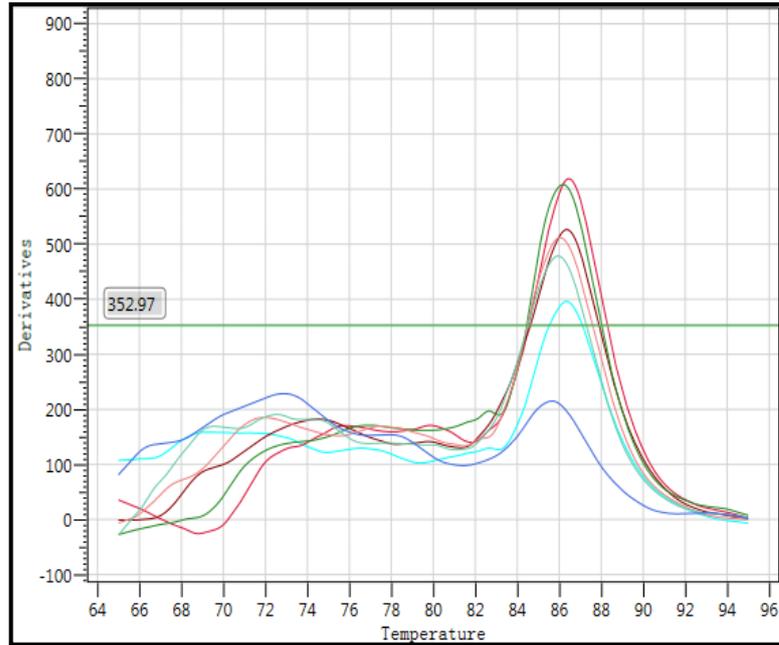


Figura 18. Curva de *melting* para o gene *GyrA*.

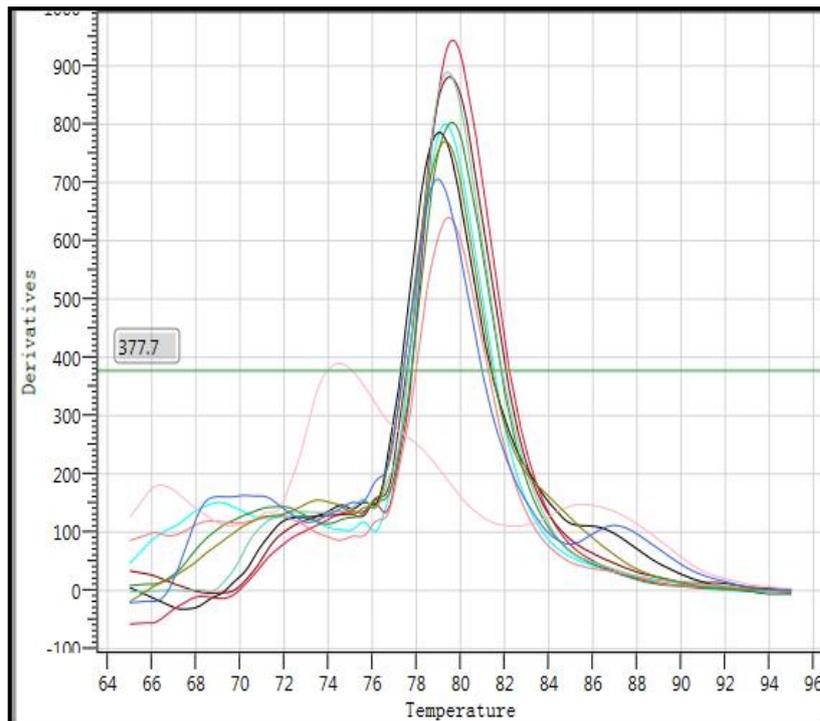
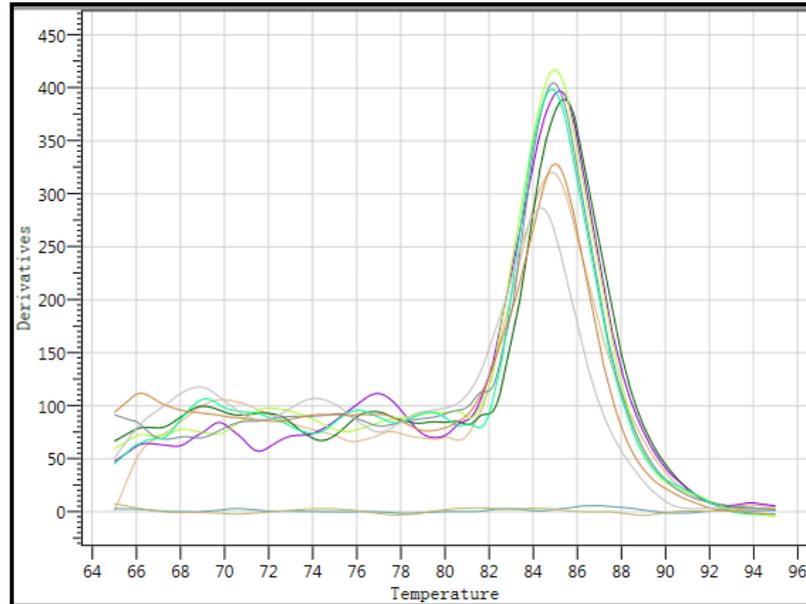
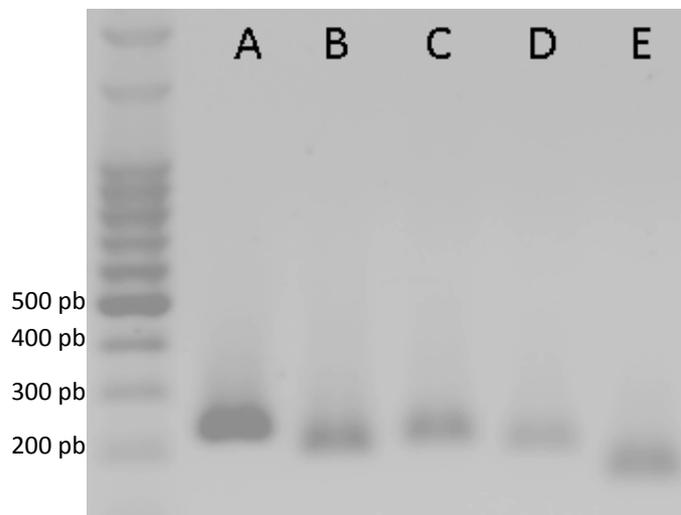


Figura 19. Curva de *melting* para o gene *fla*.



**Figura 20.** Curva de *melting* para o gene aerolisina.

A especificidade do iniciador pode ainda ser comprovada através da visualização de uma única banda e com tamanho específico no gel de agarose (Figura 21). Sendo que, a presença de mais de uma banda pode indicar a inespecificidade do iniciador (D'HAENE; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010).

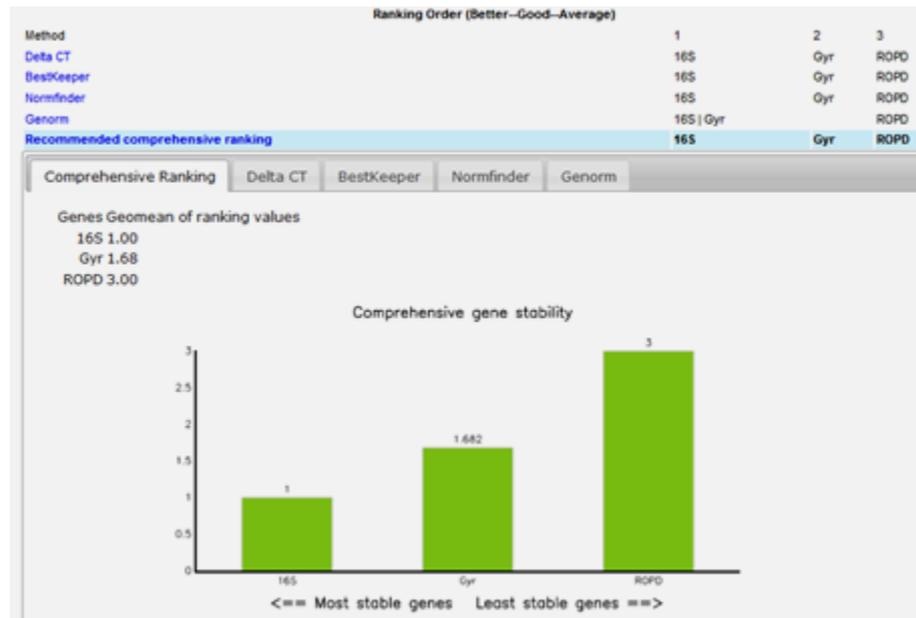


**Figura 21.** Gel de agarose com produtos oriundos da PCR em tempo real, para verificação da especificidade do iniciador através da presença de uma única banda correspondendo ao tamanho do iniciador desenhado no presente estudo. Sendo A: 16S rRNA (230pb), B: RopD (204pb), C: GyrA (214pb), D: aerolisina (203pb), E: *fla* (166pb).

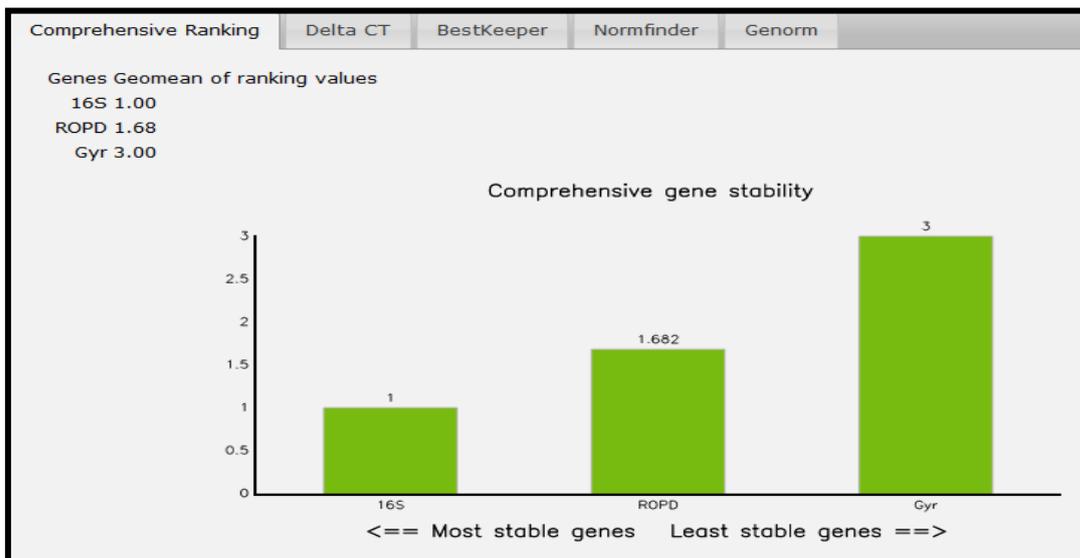
#### 6.5.4. Escolha do gene constitutivo

Neste estudo foram testados três genes constitutivos, sendo eles RopD, 16S rRNA e GyrA. Genes de referência ou constitutivos são genes que não devem apresentar diferença de expressão em função do tratamento aplicado. São genes que normalmente são expressos em níveis basais pela célula, pois estão relacionados com a codificação de produtos pertencentes a componentes constitutivos da célula como rRNA, subunidades da DNA polimerase ou de outra enzima envolvida com a replicação celular, etc... Genes constitutivos são necessários para a normalização das reações de qPCR (BUSTIN et al., 2009), pois a expressão do gene alvo será comparada com a expressão do gene constitutivo. A literatura aponta que devem ser testados no mínimo três genes para determinação daquele que apresenta maior estabilidade de expressão na célula (VANDESOMPELE et al., 2002; BRUDAL et al., 2013). O presente trabalho testou três *genes* constitutivos para a normalização das reações, seguindo os critérios indicados para estudos envolvendo qPCR.

Nos experimentos envolvendo diferentes pHs e temperaturas o gene 16S rRNA foi o que apresentou menor variação dentre as amostras em cada tratamento (Figuras 22 e 23). Nos dois experimentos foram obtidas ampliações de todas as amostras para o gene 16S. No entanto, para o gene GyrA demonstraram amplificação apenas 50% e 66,66% das amostras nos experimentos de pH e temperatura, respectivamente. E, para o gene RopD demonstraram amplificação 91,66% e 33,33% das amostras nos experimentos de pH e temperatura, respectivamente. A ausência de amplificação dos genes GyrA e RopD em todas as amostras também colaborou para indicação do 16S rRNA como o melhor gene a ser utilizado como constitutivo.



**Figura 22.** Resultado da análise de variabilidade de expressão dos genes constitutivos 16S rRNA, RopD e GyrA para a variável pH segundo ranking do *Coton EST Database*, que se baseia nas análises de Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder e Genorm. (Fonte: Arquivo pessoal, 2015)

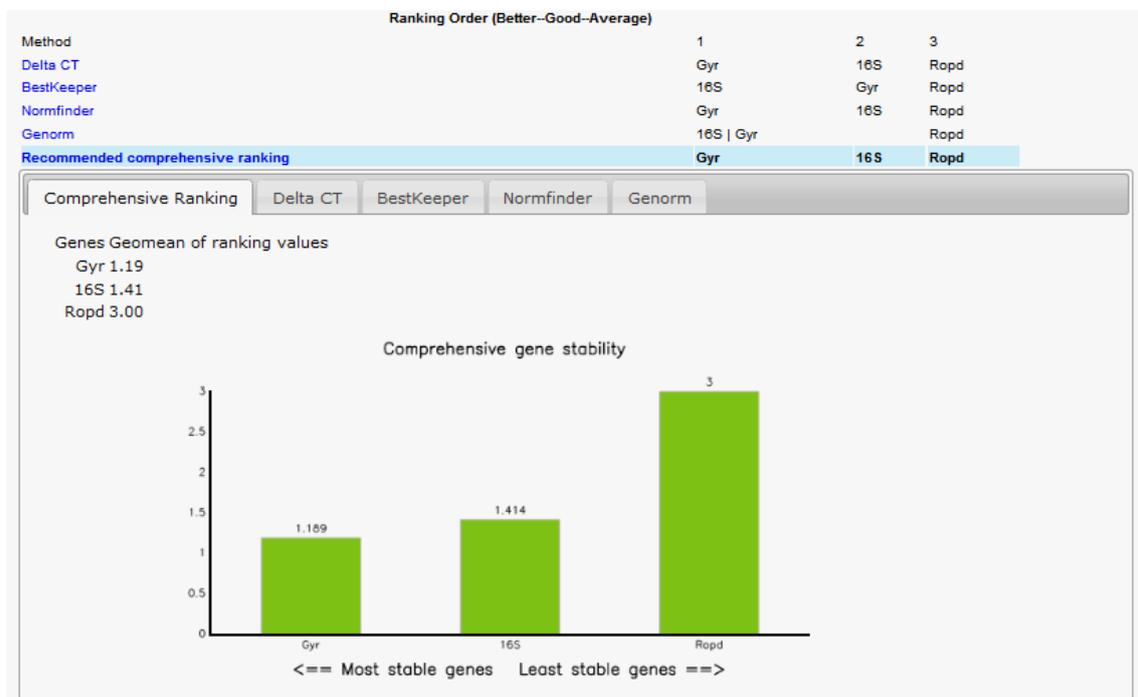


**Figura 23.** Resultado da análise de variabilidade de expressão dos genes constitutivos 16S rRNA, RopD e GyrA para a variável temperatura segundo ranking do *Coton EST Database*, que se baseia nas análises de Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder e Genorm. (Fonte: Arquivo pessoal, 2015)

No experimento referente a diferentes pontos de amônia o teste Bestkeeper e Genorm indicaram o gene 16S rRNA como o melhor constitutivo, mas na avaliação geral o gene GyrA foi o primeiro colocado (Figura 24). Nesse experimento, somente 58,33% das amostras demonstraram amplificação para o gene GyrA e 83,33% das

amostras apresentaram amplificação para o gene RopD. Já para o gene 16S rRNA todas as amostras apresentaram amplificação. Esse fato levou a escolha do gene 16S rRNA, e não do GyrA, como o gene constitutivo desse experimento.

O gene 16S rRNA é responsável pela codificação da subunidade 16S de ribossomos em organismos procariotos, sendo um dos principais genes constitutivos destes organismos e utilizado em diversos trabalhos de expressão gênica (LI et al., 2011; BRUDAL et al., 2014; CARVALHO, 2014).



**Figura 24.** Resultado da análise de variabilidade de expressão dos genes constitutivos 16S rRNA, RopD e GyrA para a variável amônia segundo ranking do *Coton EST Database*, que se baseia nas análises de Delta Ct, Bestkeeper, NormFinder e Genorm. (Fonte: Arquivo pessoal, 2015)

### 6.5.5. Quantificação relativa por qPCR de genes de virulência em isolados de *Aeromonas* spp. submetidas a diferentes variáveis físicas e químicas da água

No presente trabalho foi realizada a quantificação de mRNA através da técnica de RT-PCR em tempo real com o método de quantificação relativa, comparando-se os Cts dos genes alvo *fla* e aerolisina com os Cts do gene constitutivo 16S rRNA (PFAFFL, 2002), para os dados obtidos para os experimentos de pH, temperatura e concentração de amônia, sendo esses experimentos independentes.

A análise de qPCR para o gene *fla* indicou que as diferentes concentrações de amônia testadas (0,9 e 0,1 mg/L) influenciaram a expressão desse gene ( $p \leq 0,05$ ). Sendo que o gene *fla* demonstrou ser mais expresso no grupo submetido a condição de 0,9 mg/L de amônia em relação ao grupo controle de 0,1 mg/L. Entretanto não foram observadas diferenças significativas dos fatores pH e temperatura sobre a expressão gênica do gene *fla* ( $p \geq 0,05$ ). Assim, a variação de amônia no meio demonstrou estimular mais a capacidade da bactéria em expressar o flagelo polar do que os outros fatores ambientais testados. Isto pode ser explicado pelo fato de algumas bactérias como as *Aeromonas* spp. serem capazes de utilizar a amônia como fator de crescimento, dessa forma a maior disponibilidade de amônia no ambiente aquático pode induzir a expressão deste gene devido a oferta de nutrientes desejáveis ao crescimento bacteriano (MARTINS, 2005). O gene da aerolisina não demonstrou diferença de expressão em nenhum dos três tratamentos ( $p \geq 0,05$ ). O gene da lipase se mostrou pouco expresso, demonstrando amplificação após o ciclo 30, não permitindo assim sua análise.

As *Aeromonas* spp. são micro-organismos encontrados em diversos tipos de ambientes, muitas vezes fazendo parte da microbiota de peixes, entretanto são considerados oportunistas, e produzem uma virulência considerada multifatorial (JANDA; ABBOTT, 2010). Dentre os fatores de virulência pode-se mencionar a presença flagelo polar relacionado com a motilidade bacteriana e com os processos de adesão e colonização (KIROV et al., 2002).

De acordo com os resultados do presente trabalho foi possível observar que houve maior expressão do gene *fla* no grupo submetido a maior concentração de amônia. Os resultados do experimento de crescimento bacteriano *in vitro* (item 6.3.) demonstraram que na concentração de 0,9 mg/L houve maior crescimento bacteriano do que no grupo controle (0,1 mg/L). A função do flagelo codificado pelo gene *fla* está relacionada com a formação de biofilme, estrutura importante de proteção bacteriana, e com a motilidade do micro-organismo (CANALS et al., 2006b). Os biofilmes são estruturas compostas por uma matriz polissacarídica e arranjos bacterianos, que funcionam como um mecanismo inicial de virulência. Essa estrutura permite a adesão bacteriana em superfícies inanimadas ou bióticas, para que as bactérias possam se proteger de agentes externos e se preparar a expressão de mecanismos de virulência como produção de toxinas (CANALS et al., 2006a; ANGELES-MORALES et al., 2012). Assim, o biofilme pode funcionar como uma

estratégia de sobrevivência e adaptação a intemperes ambientais (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013). Os resultados dos experimentos *in vitro* e de expressão gênica comprovam que a maior quantidade de amônia aumenta a proliferação bacteriana que pode estar protegida na estrutura do biofilme, estando as bactérias preparadas para atacar um hospedeiro. No entanto, os resultados do experimento *in vivo* (quando se inoculou *Aeromonas* em peixes submetidos a diferentes condições ambientais) demonstraram que a mortalidade dos peixes não aumentou em função da quantidade de amônia no meio. Assim, o estabelecimento do processo doença parece estar muito mais associado ao imunocomprometimento do peixe do que às condições ideais para maior crescimento bacteriano. Ressaltando que as concentrações de amônia utilizadas no experimento *in vivo*, não ultrapassaram o limite de tolerância dos peixes, sendo assim, o experimento não conteve uma quantidade capaz de causar estresse no animal, não ficando esse susceptível à instalação de *Aeromonas* que é uma bactéria oportunista. O aspecto oportunista dessa bactéria já foi relatado na literatura quando *Aeromonas* foram isoladas principalmente de pacientes imunocomprometidos (MARQUES, 2011).

A aerolisina é um fator de virulência produzido através do sistema de secreção tipo III, relacionado com citotoxicidade e hemólise (CHAKRABORTY et al., 1987). A lipase também é um fator de virulência, estando envolvida com alterações na cascata imunológica do hospedeiro, por atuação na degradação de lipídeos (ANGUITA et al., 1993). No presente estudo aerolisina não apresentou expressão diferencial em função dos tratamentos *in vitro* e a lipase não apresentou expressão suficiente para análise. No entanto, se esses genes foram amplificados pela técnica de RT-qPCR significa que os isolados estavam expressando esses genes, mesmo que em nível basal. A expressão basal desses fatores de virulência indicam mais uma vez que o micro-organismo se encontra apto a se instalar e desenvolver infecção. Mas isso só vai acontecer se o animal estiver debilitado, o que foi indicado pelos experimentos *in vivo*, onde somente se observou aumento de mortalidade em condições estressantes para os peixes (Tabelas 7,8 e 9). Por outro lado, o aumento de expressão desses fatores de virulência, que estão diretamente relacionados com instalação da infecção no hospedeiro, só deve acontecer se o patógeno estiver em processo de infecção, evitando assim gasto desnecessário de energia (CARLOS, 2008).

Trabalhos que envolvam a análise de expressão desses genes quando em contato com o hospedeiro podem elucidar como se dá o processo de instalação da infecção.

## 7. CONCLUSÕES

Com a realização do presente trabalho foi possível identificar a presença dos fatores de virulência aerolisina, elastase, lipase, *ast*, *laf* e *fla* nos isolados de *Aeromonas* spp. o que indica o potencial de virulência desses isolados.

Os fatores ambientais pH, temperatura e concentração de amônia influenciaram o crescimento de *Aeromonas* spp. *in vitro* o que indica que esses fatores são importantes para as taxas de replicação do micro-organismo.

Foi observado que diferentes pHs e concentrações de amônia na água influenciaram a mortalidade de tilápias do Nilo inoculadas com *Aeromonas* spp..

Os resultados dos experimentos *in vitro* e *in vivo* sugerem que os fatores ambientais não atuam da mesma forma sobre a taxa de replicação bacteriana e a virulência do micro-organismo. Estando a virulência muito mais relacionada com a condição de estresse que o animal está submetido.

O gene relacionado com a formação de biofilme (*fla*) apresentou expressão aumentada em função do aumento de amônia no meio de cultura, demonstrando que a bactéria pode se encontrar protegida na estrutura de biofilme, apta para atacar o hospedeiro.

Apesar dos isolados não apresentarem diferença de expressão nas condições testadas para o gene aerolisina e ter apresentado pouca expressão do gene da lipase, não permitindo sua análise pela técnica utilizada, todos os isolados testados demonstraram expressão basal desses dois genes em todos os tratamentos, demonstrando que a *Aeromonas* spp. codifica os fatores de virulência constantemente e, que está apta a atacar o hospedeiro. Porém, como demonstrado nos experimentos *in vivo* do presente estudo, o processo doença somente será instaurado se o hospedeiro estiver debilitado, fato que é característico de um patógeno oportunista.

## 8.0. REFERÊNCIAS

ABEYTA, C.J. et al. Incidence of motile aeromonads from United States West Coast shellfish growing estuaries. **Journal of Food Protection**, v.53, n. 10, 849-855, 1990.

AGUILAR, A.P. **Expressão de genes de *Staphylococcus aureus* em resposta a concentrações subinibitória de antibióticos utilizados no tratamento da mastite bovina**. 2012, 41.f. Trabalho de Conclusão de Curso (Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola), Viçosa, Minas-Gerais, 2012.

ALBERTS, B. et al. Manipulação de proteínas, DNA e RNA, In. *Biologia Molecular da Célula*. Ed. 5ª, cap. 8, p. 573, 2010.

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of Real-Time reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization (NormFinder), applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 24, p. 5245-5250, 2004.

ANGELES-MORALES, E.B. et al. Evaluation of morphological changes of *Aeromonas caviae* Sch3 biofilm formation under optimal conditions. **Advances in Microbiology**, v. 2, p. 552-560, 2012.

ANGUITA, J.; APARICIO, L. B. R.; NAHARRO, G. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 8, 1993.

BALDISSEROTTO, B. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*, ed.2, Santa Maria-RS, 2009.

BLAST – Assembled RefSeq Genomes. 2014. Disponível em [www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Acessado em 24/06/2014

BOYD, C.E. Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming. In.: **Fisheries and Allied**, Aquaculture, Auburn University Agricultural Experimental Station, Departmental Series, Alabama, USA, p. 42. 1990.

BRUDAL, E. et al. Evaluation of reference genes for reverse transcription quantitative PCR analysis of fish-pathogenic *Franciella* strains exposed to different growth conditions. **Biomedical Center Research Notes**, v. 6, n.78, p.2-8, 2013.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169-193, 2000.

BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v.15, n.3, p. 155-166, 2004.

BUSTIN, S.A.; et al. The MIQE Guideline: Minimum Information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CANALS, R.; et al. Analysis of the Lateral Flagellar Gene System of *Aeromonas hydrophila* AH-3. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n.3 Washington – USA, 2006A.

CANALS, R. et al. Polar flagellum biogenesis in *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 2, p. 542-555, 2006B.

CARLOS, A.R.C.M. **Análise de expressão gênica em estirpes de *Enterococcus* como resposta a diferentes condições ambientais**. 2008, 45f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética) Universidade de Lisboa, Lisboa Portugal, 2008.

CARVALHO, D.M. **Análise de expressão diferencial de fatores sigma alternativos da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* durante contato com fatores do hospedeiro**. 2014, 84f. Dissertação (mestrado em biotecnologia) Universidade Federal da Bahia, 2014.

CASCÓN, A. et al. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3223-3241, 2000.

CASCÓN, A. et al. Identification of *Aeromonas hydrophila* Hybridization group 1 by PCR Assays. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1167-1170, 1996.

CERDEIRA, R. G. P.; RUFFINO, M. L.; ISAAC, V. J. Consumo de pescado e outros alimentos pela população ribeirinha do lago grande de Monte Alegre, PA-Brasil. **Revista Acta Amazônica**, n. 27, p. 213-228, Manaus- AM, 1997.

CERESER, N.D. et al. *Aeromonas* no processamento de queijos tipos frescal e colonial. **Ars Veterinária**. v. 29, n.1, p. 0,23-029, 2013.

CHACÓN, M.R. et al. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 84, n. 4, p. 269-278, 2003.

CHAKRABORTY, T. et al. Marker exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas hydrophila* demonstrates the role of aerolysin in *A. hydrophila*-associated systemic infections. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 9, p. 2274-2280, 1987.

CHARO-KARISA, H. et al. Effects of rearing conditions on low-temperature of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, juvenilis. In.: **PROCEEDINGS OF THE 6<sup>TH</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE**. Manila, Philippines, 12-16 September, 2004.

CHOPRA, A.K.; HOUSTON, C.W. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. **Microbes and Infection**, v.1, n.13, p. 1129-1137, 1999.

CHUANG, Y.C. et al. Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. **Microbiology**, v.143, p. 803-812, 1997.

COLWELL, R.R.; MACDONELL, M.T.; LEY, J. Proposal to recognize the Family *Aeromonadaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, n. 3, p. 473-477, 1986.

COMPANHIA DE DESENVOLVIMENTO DOS VALES DO SÃO FRANCISCO E DO PARNAÍBA – CODEVASF, Manual de Criação de Peixes em Tanques-Rede, 2ª ed. p. 9-54, 2013.

COSTA, A. B. **Caracterização de Bactérias do Complexo *Aeromonas* Isoladas de Peixes de Água Doce e sua Atividade Patogênica**, 2003, 54f. Tese (Doutorado em agronomia), Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo, 2003.

COSTA, T.V. et al. Aspectos do consumo e comércio de pescado em Parintins. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v.39, n.1, p. 63-75, 2013.

CREPALDI, D.V. et al. Sistemas de criação na piscicultura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n. ¾, p. 86-99, 2006.

DE-COSTE, N.J.; GADKAR, V.J.; FILION, M. Relative and absolute quantitative real-time PCR-based quantifications of *hcnC* and *phlD* gene transcripts in natural soil spiked with *Pseudomonas* sp. Strain LBUM300. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n.1, p. 41-47, 2011.

DELAMARE, A.P.L. et al. Growth of *Aeromonas* species on increasing concentrations of sodium chloride. **Letters in Applied Microbiology**, v.30, p. 57-60, 2000.

DURBOROW, R.M. et al. Columnaris Disease A bacterial infection caused by *Flavobacterium columnare*. **Southern Regional Aquaculture Center**, n.479, p. 1, 1998.

D'HAENE, B.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. **Methods**, v.50, p. 262-270, 2010.

EISENSTEIN, B.I. The polymerase Chain Reaction – a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, v.18, p. 178-183, 1990.

EL-SAYED, A.F.M. Temperature. In.: **Tilapia Culture**, s.3, p.34, CABI publishing, Massachusetts, USA, 2006.

EL-SHAFI, S.A. et al. Chronic ammonia toxicity to duckweed-feed tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.232, p. 117-127, 2004.

EL-SHERIF, M.S.; EL-FEKY, M.S.; AMAL, M. Effect of ammonia on Nile Tilapia (*O. niloticus*) performance and some hematological and histological measures. In.: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE**, ed. 8, p. 513-530, 2008.

EL-SHERIF, M.S.; EL-FEKY, A.M.S. Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. I Effect of pH. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.11, n. 3, p. 297-300, 2009.

EL-SHERIF, M.S.; EL-FEKY, A.M.S. Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. II Influence of different water temperatures. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.11, n. 3, p. 301-305, 2009.

EL-SHEBLY, A.A.; GAB, H.A.M. Effect of chronic ammonia exposure on growth performance, serum growth hormone (GH) levels and gill histology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal Microbiology Biotechnology Research**, v.4, n.1, p. 183-197, 2011.

FARAWAY, J.J. Extending the Linear Model with R: Generalized Linear Mixed Effects and Nonparametric Regression Models. In.: **Statistical Science**, Chapman & Hall/CRC Texts, 2005.

FARFAN, M. et al. Study of *Aeromonas* species based on the flagellin (flaA) gene. In.: GENBANK: B3TZ65\_9GAMM, 2008.

FERREIRA, A.A.; NUÑER, A.P.O.; ESQUIVEL, J. R. Influência do pH sobre ovos e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Osteichthyes, Siluriformes). **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 477-481, Maringá-PR, 2001.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G.; Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.08-14, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION of the UNITED NATIONS – FAO, **Trends in the fisheries sector**, part.3, p. 140-145, 2013.

FRANZOLIN, M.R. *Aeromonas* e *Plesiomonas*, In.: **Microbiologia**, 4ª ed, Cap. 46, p. 345 – 346, São Paulo-SP, 2004.

FREDERICKS, D.N.; RELMAN, D.A. Improved Amplification of Microbial DNA from Blood Cultures by Removal of the PCR Inhibitor Sodium Polyanetholesulfonate. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.10, p.2810-2816, 1998.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes, In. **Bergey Manual of Systematic Bacteriology**, Ed. 2ª, New York, USA, 2004.

GAVÍN, R. et al. Lateral Flagella are requerid for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, p. 77-83, ELSEVIER, 2003.

GAZZOLA, A.C. **Efeito da amônia e do oxigênio dissolvido na sobrevivência de alevinos de dorado, *Salminus brasiliensis***. 2003, 38f. Dissertação (Mestrado em aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florinópolis, 2003.

GHATAK, S. et al. Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. By restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. *Letters in Applied Microbiology*. v.44, p. 550-554, 2007.

GIBSON, U. E. M.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 995-1001, 2013.

GONI-URRIZA, M. et al. Type II topoisomerase quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, and *A. sobria* complexes and mutations associated with quinolone resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.2, p.350-359, 2002.

GRIM, C. J. et al. Characterization of *Aeromonas hydrophila* Wound Pathotypes by Comparative Genomic and Functional Analyses of Virulence Genes. **mBio**, v. 4, n.2, p. 1-13, 2013.

GUERRA, I.M.F. et al. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: Prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 638-643, 2007.

HARGREAVES, J.A.; TUCKER, C.S. Managing ammonia in fish ponds. **Southern Regional Aquaculture Center**, n. 46063, p. 1-8, 2004.

HEIN, G.; BRIANESE, R.H. Modelo EMATER de produção de tilápias. 2004, 27f. **Boletim informativo**, EMATER, Toledo – Paraná, p. 1-27, 2004.

HEUZENROEDER, M.W.; WONG, C.Y. Distribution of two haemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: Correlation with virulence in a suckling mouse model. **FEMS Microbiol Lett**, v.174, n. 1, p. 131-136, 1999.

HOWARD, S.P. et al. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Bacteriology**, v.169, n.6, p. 2869-2871, 1987.

HORWITZ, M. et al. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. **Nature Genetics**, v. 23, p. 433-436, 1999.

HUANG, C.H.; LAI, H.T.; WENG, Y.M. Suitability of hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) muscle for gel. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 33, n. 4, p. 339-344, 1998.

IBELLI, A.M.G. **Quantificação de mRNA de genes relacionados à resposta imune em bovinos infectados com endoparasitos do gênero**. 2008, 111f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – São Paulo, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, **Estatística da Pesca 2007 Brasil Grandes Regiões e Unidades da Federação**, p. 1-80-97 2007.

ISONHOOD, J.H.; DRAKE, M. *Aeromonas* species in foods. **Journal Food Protection**, v. 65, p. 575-582, 2002.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy pathogenicity, and infection, **Clinical Microbiology review**. v.23, n. 1, p. 35-73, 2010.

JANDA, J.M. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*, **Revist Clinical Microbiology**, 1991

JUSTI, K.C. et al. Efeito da temperatura da água sobre desempenho e perfil de ácidos graxos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), **Acta Science Animal**, v.27, n.4, p. 529-534, 2005.

KHAJANCHI, B.K. et al. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.7, p. 2313-2325, 2010.

KINGOMBE, C.I.B. et al. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5293-5302, 1999.

KIROV, S.M. et al. Lateral Flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n.2, p. 547-555, 2002.

KIROV, S.M. The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.20, p. 179-198, 1993.

KOZINSKA, A. et al. Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p. 1034-1041, 2002.

KUBITZZA, F. Qualidade da água na produção de peixes parte III (final). **Panorama da Aquicultura**, v. 8, n. 47, p. -3543, 1998.

KUBITZZA, F. Manejo nutricional e alimentar, **Panorama da Aquicultura**, v. 10, n.60, 2000.

KUBITZZA, F. Antecipando-se às doenças na tilapicultura, **Panorama da Aquicultura**, v. 15, 2005.

KUBITZZA, F. Boas práticas de manejo sanitário, **Panorama da Aquicultura**, v. 19, n. 112, 2009.

KUBITZZA, F. O status atual e as tendências da tilapicultura no Brasil, **Panorama da Aquicultura**, v. 21, nº, 124, p. 10-19, 2011.

KUÇUK, S. Acute toxicity of ammonia to blue tilapia, *Oerochromis aureus* in saline water. **African Journal of Biotechnology**, v.13, p. 1550-1553, 2014.

LAMBERT, R.J.W.; BIDLAS, E. An investigation of the Gamma hypothesis: A predictive modelling study of the effect of combined inhibitors (salt, pH and weak acids) on the growth of *Aeromonas hydrophila*. **International Journal of Food Microbiology**, n. 115, p. 12-28, 2007.

LAMY, B.; LAURENT, F.; KODJO, A. Validation of a parcial rpod gene sequence as a tool for phylogenetic identification of aeromonads isolated from enviromental sources. **Canadian Journal of Microbiology**, v.56, n. 3, p. 217-228, 2010.

LANGER, S.L.; VARGAS, V.M.F. Amônia e possível ação de bactérias em *Mugil platanus* (MUGILIDAE), no rio Tramandaí – RS – Brasil. In.: **IV SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE QUALIDADE AMBIENTAL** – Porto Alegre, 2004.

LI, G.Y; LI, J.; XIAO, P.; GUO, Y.H.; MO, Z.L. Detection of type III secretion gene as an indicator for pathogenic *Edwardsiella tarda*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 213-219, 2011.

LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p.13-30, 2011.

MARQUES, C.L.M. **Caracterização molecular de cepas de *Aeromonas* spp. isoladas durante surto de diarreia em São Bento do Uma, PE em 2004.** 2011. 72f. Tese (Doutorado em Saúde Pública), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

MARTINS, A.G.L.A. **Efeitos da emissão dos efluentes domésticos na proliferação de *Aeromonas* spp. em águas de superfície e pescado do estuário do rio Bacanga, São Luís/MA.** 2005, 107f. Dissertação (Mestrado-ciências marinhas tropicais) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2005.

MERCANTE, C.T.J. et al. Qualidade da água em viveiro de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): caracterização diurna de variáveis químicas, físicas e biológicas, São Paulo, Brasil. **Bioikos**, v. 21, n. 2, p. 79-88, 2007.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura, Brasil 2010**, 2012.

MELO, F.L. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em PCR para a detecção de *Schistosoma mansoni***. 2006, 113f. **Tese** (Doutorado em Saúde Pública) Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife-PE/Brasil, 2006.

MOLENBERGHS, G.; VERBEKE, G. Models for Discrete Longitudinal Data. In.: **Statistic**, Springer Series, 2005.

MORENO, N.; AGUDELO-FLÓREZ, P. Aplicación de las pruebas de PCR simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v.27, n. 4, p. 584-586, 2010.

MOURA, G. S. et al. Desempenho e atividade de amilase em tiápias-do-nilo submetidas a diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 11, p. 1609-1615, Brasília,DF, 2007.

NAM, I.Y.; JOH, K. Rapid detection of virulence of *Aeromonas* isolated from a trout by hexaplex-PCR. **Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 297-304, 2007.

OBA, E.T.; MARIANO, W.S.; SANTOS, L.R. B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável, **Manejo e Sanidade de Peixes e Cultivo**. Cap.8, p. 226-247, EMBRAPA - MACAPÁ AM, 2009.

OLIVEIRA, S.R. et al. Tolerance to temperature, ph, ammonia and nitrite in cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi*, an amazonian ornamental fish. **Acta Amazonica**, v. 38, n.4, p. 773-780, 2008.

OLIVEIRA, S.R. et al. LD<sub>50</sub> of the bacteria *Aeromonas hydrophila* matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Acta Amazonica**, v.41, n. 2, p. 321-326, 2011.

OLIVEIRA, D.E. **Caracterização, pesquisas dos genes de virulência e  $\beta$ -Lactamases em *Aeromonas hydrophila*, provenientes de esgoto e lodo tratados**. 2011, 99f. Dissertação (Mestrado-Saúde Pública) Universidade de São Paulo-Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, São Paulo, 2011.

OLIVEIRA, C.M.G. et al. Detecção de *Aeromonas hydrophila* em água, comedouro e diferentes órgãos de *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758, tilápia do Nilo, da região semi-árida da Bahia, In.: **JORNADA DE ENSINO PESQUISA E EXTENSÃO - JEPEX**, Recife-PE, 9-13 de Dezembro, 2013.

OLIVEIRA, S.T.L. et al. *Ascophyllum nodosum* in the diet of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effect after inoculation of *Aeromonas hydrophila*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, cap. 4, p. 403-408 (2014).

OLIVIER, G.; LALLIER, R.; LARIVIERE, S. A toxigenic profile of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* isolated from fish. **Canadian Journal of Microbiology**, v.27, p. 230-232, 1981.

OSTRENSKI, A.; BOERGER, W. **Piscicultura**: Fundamentos e Técnicas de Manejo. Liv. Edit. Agropecuária Ltda, Guaíba, RS, p.117, 1998.

PABLOS, M. et al. Identity, virulence genes, and clonal relatedness of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea and drinking water. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, p. 1163 – 1172, Berlim – Alemanha, 2010.

PALUMBO, S. A. et al. Model for the Aerobic Growth of *Aeromonas hydrophila* K144, **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia-USA. Ed. Elsevier, 1988.

PALUMBO, S. A. et al. Characterization of the *Aeromonas hydrophila* Group Isolated from Retail Foods of Animal Origin, **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.5, 1989.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMORO, R.M. **Doenças de peixes: Profilaxia Diagnósticos e Tratamentos**. Editora da Universidade Estadual de Maringá. 264p. 2002.

PEIXOTO, F.R. et al. Desenvolvimento Regional e Recursos Territoriais: uma análise da piscicultura no Baixo São Francisco, **Revista de Economia Mackenzie**, v.8, n.3, p. 30-51, 2010.

PEREIRA, C.M.; LAPOLLI, F.R. Criação de tilápias no efluente doméstico tratado em lagoas de estabilização. **Biotemas**. v. 22, n. 1, p. 93-102, 2009.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2001

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. 2-10, 2002.

PFAFFL, M.W. Quantification strategies in real-time PCR. **A-Z of quantitative PCR**, cap. 3, p. 87-112, 2004.

PFAFFL, M.W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Bestkeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 509-515, 2004.

QUINN, P.J. et al. **Aeromonas, Plesiomonas and Vibrio species** In.: Microbiology Veterinary Clinical, Sec. 2, Cap. 20, p. 243-247, 1994, Virginia-USA.

RAEL, R.M.; FRANKENBERGER JUNIOR, W.T. Influence of pH, salinity, and selenium on the growth of *Aeromonas veneroni* in evaporation agricultural drainage water. **Water Research**, v. 30, n. 2, p. 422-430, 1996.

RANDALL, D.J.; TSUI, T.K.N. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p.17-23, 2002.

RANDEGGER, C.C.; HACHLER, H. Real-Time PCR and melting curve analysis for reliable and rapid detection of SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 2001.

RIRIE, K.M.; RASMUSSEN, R.P.; WITTEWER, C.T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 245, p.154-160, 1997.

RODRIGUES, E. **Pesquisa de *Aeromonas* spp. em Tilápia (*Oreochromis niloticus*), cultivadas no estado do Rio de Janeiro-Brasil: Isolamento identificação de espécies e avaliação da sensibilidade antimicrobiana**. 2007, 208f. **Tese** (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal), Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, 2007.

ROJAS, N. E.; ROCHA, O.; AMARAL, J. A. B. O EFEITO DA ALCALINIDADE DA ÁGUA SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E O CRESCIMENTO DAS LARVAS DO CURIMBATÁ, *Prochilodus lineatus* (CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE), MANTIDAS EM LABORATÓRIO. **Boletim do Instituto de Pesca São Paulo**, v. 27, p.155-162, 2001.

ROTTA, M.A. Utilização do ácido ascórbico (vitamina C) pelos peixes, 2003, 54f. **Documentos EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA**, n. 49, 2003.

SÁ, M.C.A. et al. Distribution of *PLD* and *FagA*, *B*, *C* and *D* genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. **Genetics and Molecular Biology**, v.36, n. 2, p. 265-268, 2013.

SANTOS, P.G. et al. Association of *Aeromonas caviae* polar and lateral flagella with biofilm formation. **Applied Microbiology**, n. 52, p. 49-55, 2010.

SANTOS, F.G.B. **Caracterização fenotípica e molecular de bactérias com potencial patogênico em Pacamã (*Lophosilurus alexandri* Steindachner, 1877).** 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2011.

STANDART METHODS, Phenate method, In.: **Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater**, ed. 22, p. 4-115, 2012.

SAUTOR, M. et al. The effects of temperature, water activity and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila* and on its subsequent survival in microcosm water. **Journal of Applied Microbiology**, n.95, p. 807-813, 2003.

SAVLI, H. et al. Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real time quantitative RT-PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 403-408, 2003.

SCHMIEL, D. H.; MILLER, V. L. Bacterial phospholipases and pathogenesis. **Microbes and Infection**, v.1, p. 1103 – 1112, Washington, USA, 1999.

SEN. K. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. **Canadian Journal Microbiology**, n. 51, p. 957-966, Ottawa, Canadá, 2005.

SEN. K.; RODGERS, M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1077-1086, 2004.

SHA, J.; KOZLOVA, E.V.; CHOPRA, A.K. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 4, p. 1924-1935, 2002.

SILVA, R.M.L. **Bactérias dos gênero *Aeromonas* e indicadores de qualidade de água em pisciculturas da região da Baixada Ocidental Maranhense.** 2010, 75f.

Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-Unesp, Jaboticabal São Paulo, 2010.

SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real time – PCR – The Comparative delta Ct-method. **BMC Molecular Biology**, n.7, v. 33, p. 1-9, 2006.

SINGH, V. et al. Gene cloning, expression, and characterization of recombinant aerolysin from *Aeromonas hydrophila*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 7, p. 1985-1991, 2010.

SUN, L.T.; CHEN, G.R.; CHANG, C.F. The physiological responses of tilapia exposed to low temperatures, **Journal of Thermal Biology**, n. 17, p. 149-153, 1992.

TRAKHNA, F.; MAAROUFI, A.; GADONNA-WIDEHEM, P. Using a real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) method for reliable enumeration of *Aeromonas hydrophila* in water sample. **Academic Journals**, v. 7, n. 19, p. 2119-2126, 2013.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n.22, p. 113-238, 2013.

UNITED NATIONS EDUCACIONAL SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION - UNESCO, Chemical methods for use in marine environmental monitoring, In.: **Manual and guides**, v.12, p. 1-53, 1983.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, 2007.

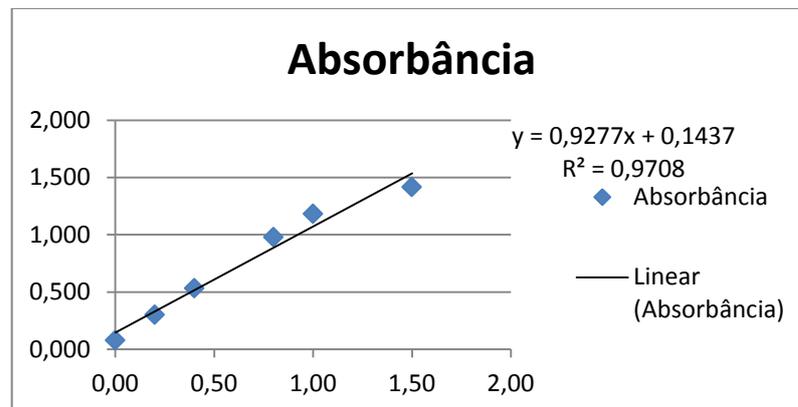
VANDENSOPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes (Genorm). **Genome Biology**, v.3, n.7, p. 1-12, 2002.

VILCHES, S. et al. Complete type III Secretion System of a Mesophilic *Aeromonas hydrophila* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, Washington – USA, 2004.

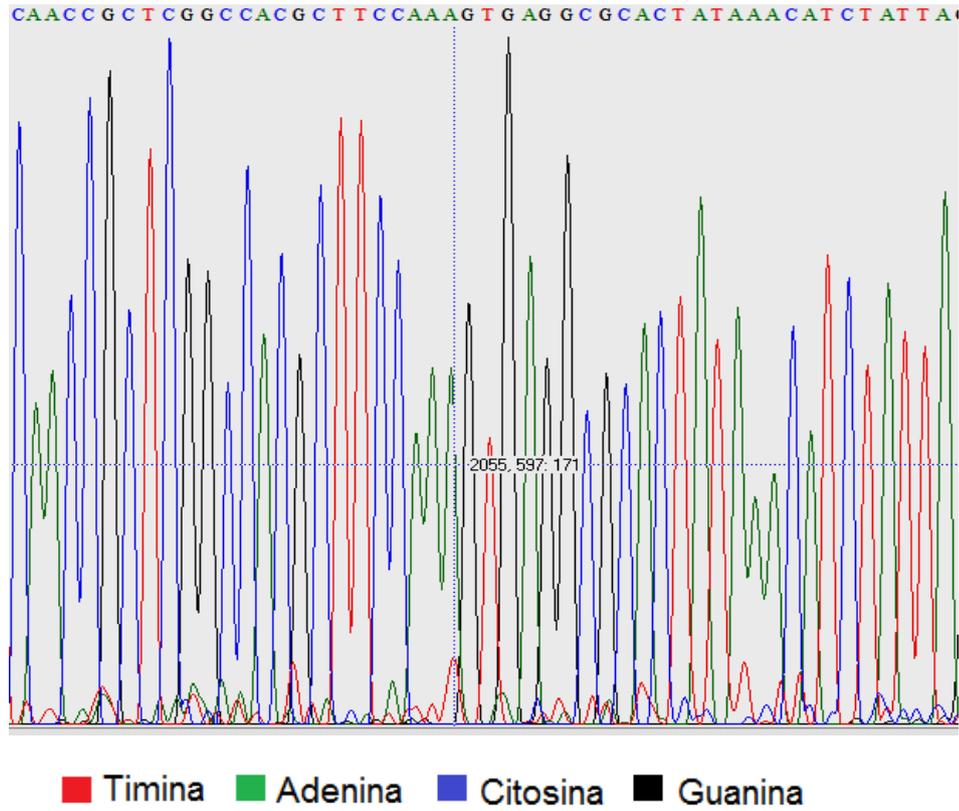
WEISS, L.A.; ZANIBONI-FILHO, E. Survival of diploid and triploid *Rhamia quelen* juveniles in different ammonia concentrations, **Aquaculture**, n. 298, p. 153-156, 2009.

YAMADA, Y. *Aeromonas hydrophila* 16S rRNA gene. GenBank databases AB034762.1 acesso em 31/10/14  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ab034762.1>>

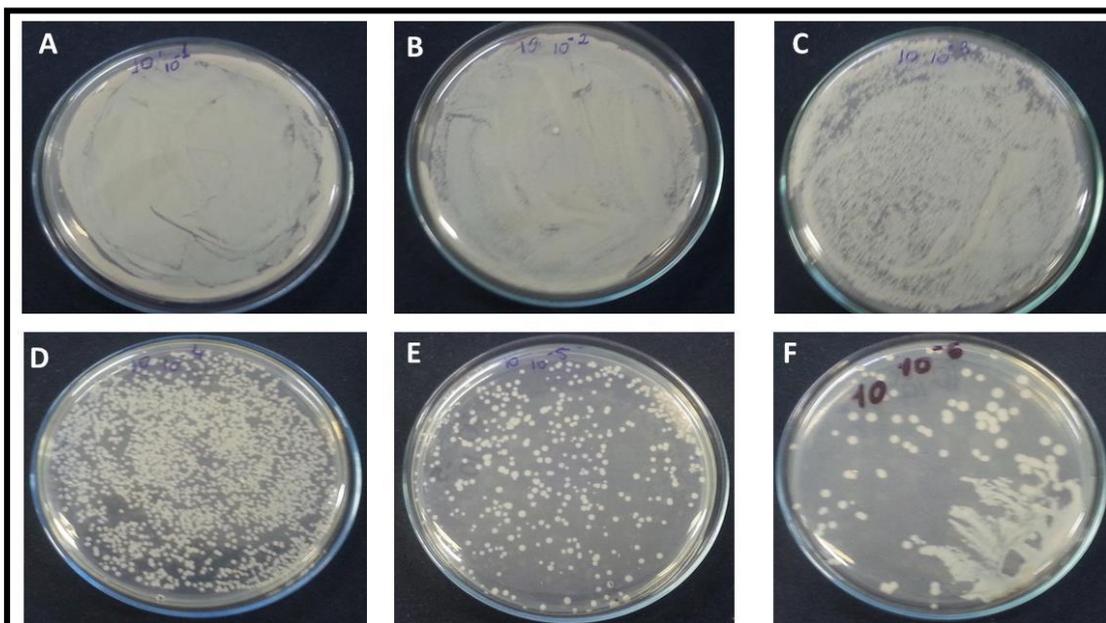
## 9. ANEXOS



**Figura 2.** Curva padrão, utilizada no método do azul de indofenol, para detecção da amônia na água.

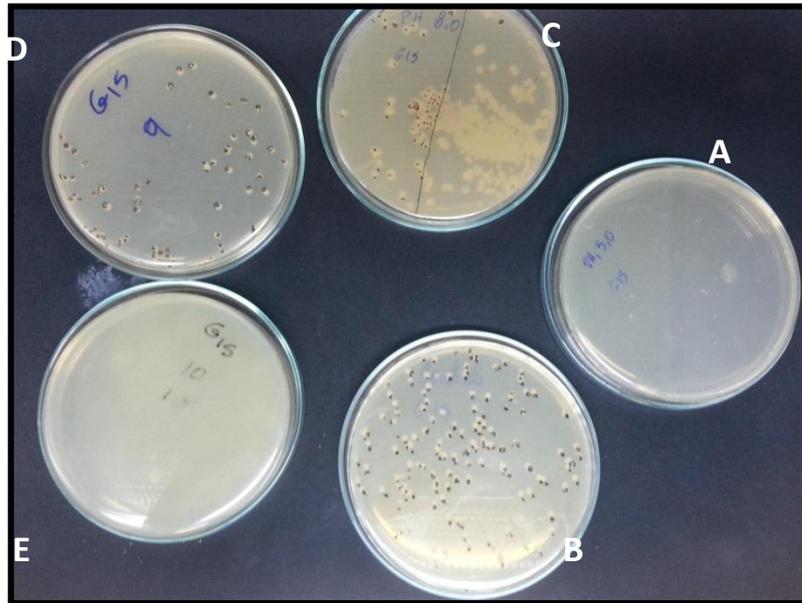


**Figura 3.** Eletroferograma obtido para análise dos isolados quanto sendo pertencentes ao gênero *Aeromonas* spp.

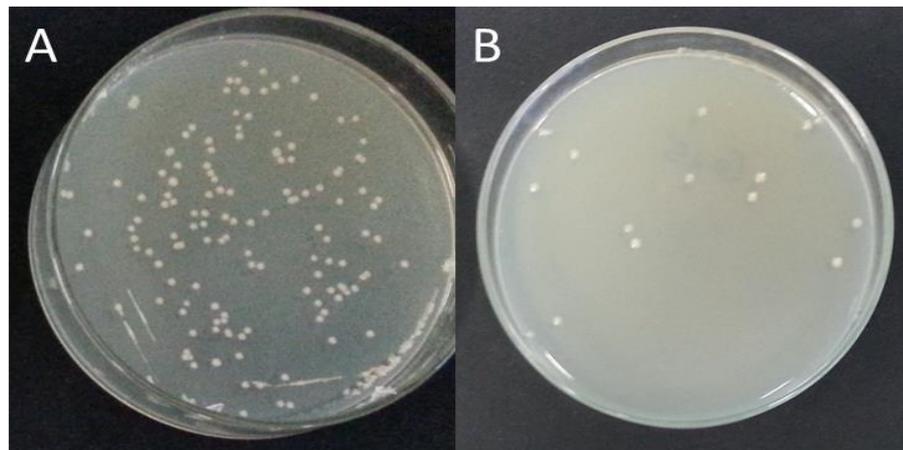


**Figura 4.** Placas contendo TSA inoculadas com diferentes diluições de *Aeromonas* spp. para verificação da concentração de inóculo adequada para contagem de Unidades Formadoras de

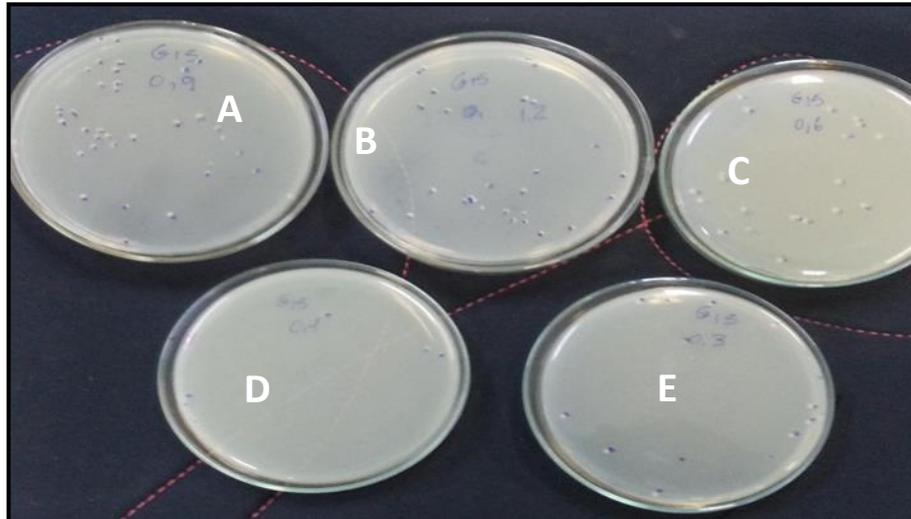
Colônias. Imagem A: diluição  $10^{-1}$ ; imagem B: diluição  $10^{-2}$ ; Imagem C: diluição  $10^{-3}$ ; Imagem D: diluição  $10^{-4}$ ; Imagem E: diluição  $10^{-5}$ ; Imagem F: diluição  $10^{-6}$ . As contagens realizadas nas diluições de  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  não foram registradas fotograficamente devido ao baixo número de UFC ( $< 30$ ). Fonte: Arquivo pessoal, (2014)



**Figura 5.** Isolado G15 submetido a diferentes pHs demonstrando o crescimento bacteriano. Letras, A, B, C, D e E representam os pHs 5,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10, respectivamente. Fonte: Arquivo pessoal, (2014)



**Figura 6.** Isolado G38 submetido a diferentes temperaturas. Placa A: Temperatura 28 °C, placa B: Temperatura 31 °C. Fonte: Arquivo pessoal, (2014)



**Figura 7.** Isolado G15 submetido a diferentes concentrações de amônia. Placa A: 0,9 mg/L, placa B: 1,2 mg/L, placa C: 0,6 mg/L, placa D: 0,1 mg/L e placa E 0,3 mg/L. Fonte: Arquivo pessoal, (2014)